

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

TARTU ÜLIKOOL  
ARSTITEADUSKOND  
BIO-JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT  
RNA BIOLOOGIA UURIMISGRUPP

Kerstin Peedosaar

**MiR-146a ja miR-146b ekspressioon inimese primaarsetes bronhiaalsetes  
epiteelrakkudes**  
Bakalaureusetöö

Juhendajad	PhD Ana Rebane
	MSc Toomas Runnel
	PhD Mariliis Klaas

TARTU 2015

# SISUKORD

SISUKORD .....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Allergia ja astma.....	7
1.2. Tsütokiinid allergilises astmas .....	9
1.3. Kopsuepiteelrakud ja nende roll astmas.....	9
1.4. MikroRNA-d .....	11
1.4.1. MikroRNA-d immuunsüsteemi regulaatoritena .....	12
1.4.2 MikroRNA-d astmas .....	14
1.5. MikroRNA-146 perekond .....	14
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	16
2.1. Töö eesmärgid .....	16
2.2. Materjal ja metoodika.....	16
2.2.1. Kasutatud rakuliinid ja söötmed .....	16
2.2.2. HBE rakkude kasvatamine ja stimuleerimine.....	16
2.2.3. RNA eraldamine .....	17
2.2.4. RNA kontsentratsiooni mõõtmine .....	18
2.2.5. miRNA spetsiifilise cDNA süntees .....	18
2.2.6. Kvantitatiivne reaal-aja PCR (qPCR) miRNA-de suhtelise ekspressiooni määramiseks.....	18
2.2.7. mRNA spetsiifilise cDNA süntees.....	19
2.2.8. qPCR mRNA-de suhtelise ekspressiooni määramiseks.....	19
2.2.9. Reaal-aja qPCR-i andmete analüüs.....	20
2.3. TULEMUSED.....	21
2.3.1. miR-146a ja miR-146b ekspressioon inimese primaarsetes bronhiaalsetes epiteeli rakkudes .....	21
2.3.2. miR-146a ja miR-146b otsese ja kaudse märklaua CCL5 ja IL-8 ekspressioon HBEC rakkudes .....	21
2.3.3. miR-146a ja miR-146b ekspressiooni võrdlus kontrolldoonori ja astma patsiendi HBEC rakkudes IFN- $\gamma$ ja TNF- $\alpha$ stimulatsioonil .....	22
2.3.4. CCL5 ja IL-8 ekspressiooni võrdlus kontrolldoonori ja astma patsiendi HBEC rakkudes IFN- $\gamma$ ja TNF- $\alpha$ stimulatsioonil .....	24

2.4. ARUTELU JA JÄRELDUSED .....	25
KOKKUVÕTE .....	28
SUMMARY .....	29
TÄNUSÕNAD .....	30
KASUTATUD KIRJANDUS.....	31
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks .....	40

## KASUTATUD LÜHENDID

AGO – argonaut valk (*Argonaute*)

AP-1 – aktivaator proteiin

ATI – alveolaarne epiteelrakk tüüp I

ATII – alveolaarne epiteelrakk tüüp II

BEGM – bronhiaalse epiteelraku kasvusööde (*Bronchial epithelial cell growth medium*)

BPE – veise ajuripatsi ekstrakt (*Bovine pituitary extract*)

CCL5 – kemokiin C-C motiiviga ligand (*Chemokine C-C motif ligand*)

cDNA – komplementaarne DNA (*Complementary DNA*)

COX-2 – tsüklooksügenaas-2

C<sub>T</sub> – lävitsükkel (*Threshold cycle*)

EF1A – elongatsioonifaktor-1 alfa

FcεRI – IgE retseptor

GA – gentamütsiin ja amfoteritsiin-B (*Gentamicin and Amphotericin-B*)

GM-CSF – granulotsüüt makrofaagi koloonia stimulatsiooni faktor (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*)

HBEC – inimese bronhiaalne epiteelrakk (*Human bronchial epithelial cell*)

hEGF – inimese epidermaalne kasvufaktor (*Human epidermal growth factor*)

IFN-γ – interferoon gamma

IgE – immunoglobuliin E

IL – interleukiin (*Interleukin*)

IRAK1 – interleukiin-1 retseptor-seoseline kinaas 1 (*interleukin-1 receptor-associated kinase-1*)

IRF4 – interferooni regulaatorfaktor 4 (*interferon regulatory factor 4*)

JAK-STAT – *Janus kinase - signal transducer and activator of transcription*

JNK – c-jun N-terminal kinaas

LPS – lipopolüsahhariid

MAP – p38 mitogeeni aktiveeritud kinaas

miRISC – miRNA-indutseeritud vaigistav kompleks (*miRNA induced silencing complex*)

miRNA – mikroRNA

NF-κB – tuumafaktor κB (*Nuclear factor kappa B*)

NFAT – T-rakkude aktiveeritud tuumafaktor (*Nuclear factor of activated T-cells*)

nt – nukleotiid

OVA – ovalbumiin

PAMP – patogeenidega seotud molekulaarsed mustrid (*Pathogen-associated molecular patterns*)

PBS – fosfaadiga puhverdatud soolalahus (*Phosphate buffered saline*)

PRDM1 – PR-domääni tsinksõrme proteiin-1 (*PR domain zinc finger protein 1*)

pre-miRNA – prekursor mikroRNA

pri-miRNA – primaarne mikroRNA

PRR – patogeeni äratundev retseptor (*Pathogen recognition receptor*)

qPCR – kvantitatiivne reaalaaja PCR

T-reg – regulatoorne T rakk

TCR – T-raku retseptor (*T-cell receptor*)

TGF- $\beta$  – transformeeriv kasvutegur beeta (*Transforming growth factor beta*)

Th2 – tüüp-2 T-abistaja rakk

TLR – Tolli-laadne retseptor (*Toll-like receptor*)

TNF- $\alpha$  – kasvaja nekroosifaktor alfa (*Tumor necrosis factor alpha*)

TRAF6 – TNF retseptor-seoseline faktor 6 (*TNF receptor-associated factor-6*)

UTR – transleerimata regioon (*Untranslated region*)

## SISSEJUHATUS

Astma on üks levinumaid kroonilisi hingamisteede haigusi terves maailmas. Hinnatakse, et ligi 300 miljonit inimest igast rassist ja vanusest üle maailma põevad astmat. Haiguse teket on seostatud suureneva urbaniseerumisega, kuid täpseid tekkemehhanisme pole teada. 2025. aastaks on arvatav astmaatikute hulk maailmas suurenenud peaaegu 33% võrra praegustest astma haigetest ehk lisanduks veel 100 miljonit haiget. Hinnanguliselt sureb ülemaailmselt 1 astmaatik 250-st, mil paljud surmadest oleksid ennetatavad õigeaegse ravi saamisega. Astma on väga heterogeenne põletikuline immuunsüsteemi haigus. Allergiline astma on paljudel juhtudel seotud tugevama Th (T *helper*) 2-tüüpi immuunvastusega, millele on iseloomulikud tsütokiinid interleukiin (IL)-4, IL-5, IL-13.

MikroRNA-del (miRNA) on oluline roll organismi immuunsüsteemis, kus nad osalevad nii immuunrakkude diferentseerumises kui ka immuunvastuse regulatsioonis. Näiteks, patogeenide äratundmisel Tolli-laadsete retseptorite (TLR, *Toll-like receptors*) poolt monotsüüdid aktiveeritakse ning suureneb miRNA-146a ekspressioon, mis omakorda töötab immuunvastuse mahasurumisel ja aitab vältida liiga tugevat põletikulist vastust.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida miRNA-146 perekonna liikmete miR-146a ja miR-146b (miR-146a/b) ja nende poolt mõjutatavate kemokiinide, kemokiin C-C motiiviga ligand (CCL5) ja IL-8, ekspressiooni regulatsiooni tsütokiinidega stimuleeritud tervete ja astmaga doonorite primaarsetes bronhiaalsetes epiteelrakkudes (HBEC - *human bronchial epithelial cells*). Antud bakalaureuse töö koostati Tartu Ülikooli arstiteaduskonna alla kuulavas bio- ja siirdemeditiini instituudis RNA bioloogia uurimisgrupis.

Astma, primaarsed bronhiaalsed epiteeli rakud, tsütokiinid, mikroRNA, miR-146a/b

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Allergia ja astma

Allergiaks loetakse mitmeid eraldi- või koosesinevaid haigusi, näiteks astmat, sinusiiti, ja toiduallergiat (Sicherer & Sampson, 2007). Allergia tekib kui immuunsüsteem reageerib kahjutule välises keskkonnas leiduvale antigeenile ehk allergeenile. Allergia on enamasti vahendatud Th2-tüüpi rakkude ning allergeeni äratundva immuunoglobuliin E (IgE) tüüpi antikehade poolt (Kay, 2000; Sicherer & Sampson, 2007; Holgate & Polosa, 2008). Enamasti avalduvad sümptomid ja toimuvad kahjustused epiteelkudedes – näiteks epidermises või limaskestades. Esmase allergeenidega kokkupuutumise ajastus on oluline mitmete allergiate kujunemisel. Näiteks raseda ema või väikelapse kokkupuutel koduloomadega väheneb tunduvalt allergia tekkimise risk lapse hilisemas eas (Holgate & Polosa, 2008).

Kui organism on teatud allergeenile tundlikuks muutunud, siis järgnevad kokkupuuted selle allergeeniga põhjustavad IgE seondumise kõrge afiinsusega IgE retseptoriga (FcεRI) nuumrakkudel ja basofiilidel. Seondumine põhjustab nuumrakkude degranuleerimist ja tsütokiinide vabanemise basofiilide poolt, mis stimuleerivad varajast allergilist immuunvastust (Locksley, 2010; Stone, Prussin, & Metcalfe, 2011).

Astma on pärilikkusest ja keskkonnast sõltuv heterogeenne immuunsüsteemi haigus, mida iseloomustab hingamisteede kitsenemine ja sellega kaasnev vilisev hingamine (Kay, 2000; Lloyd & Saglani, 2010). Allergiline astma on sageli seotud liiga tugeva Th2-tüüpi immuunvastusega, mida tavaolukorras kasutatakse rakuväliste patogeenide ja toksiinide korral. Lisaks sellele on olemas ka Th1-tüüpi immuunvastus, mida kasutatakse rakusiseste patogeenide vastu (Janeway, *et al.*, 2001). Ebatervislik toitumine, sealhulgas vitamiinide ja antioksüdantide puudus toidus, soodustab astma teket. Samuti on täheldatud, et astmale eelneb tihti allergiline nohu, mis viitab võimalusele, et see on oluline riskifaktor astma tekkimisel (Holgate & Polosa, 2008). Astma olemasolu võimalust peaks uurima neil patsientidel, kellel esineb pidev köha, aevastamine, kitsustunne rinnus ja hingeldamine. Kuna sümptomid on varieeruvad, on astma diagnoosimine keeruline. Seetõttu välistatakse haigused, mis võivad eelnimetatud sümptomeid esile kutsuda ning kontrollitakse perekonna haiguste ajalugu. Astma diagnoos väikestel lastel vanuses null kuni kolm aastat on väga keeruline sümptomite mittespetsiifilisuse tõttu ja seetõttu, et spiromeetria tulemusi ei saa alla 6-aastaste patsientide puhul usaldada. Nende puhul on efektiivseks meetodiks prooviravi läbiviimine (Kaplan, *et al.*, 2009; Liu, *et al.*, 2014; GINA, 2015). Astma leevendamiseks nii lastel kui

täiskasvanutel on soovitatav selle ennetamine või sümptomaatiline ravi. Kui inimene on allergiline näiteks tolmule või koduloomadele, siis on võimalik allergeenidega kokkupuudet vähendada või koguni vältida. Astmahoogude ennetamiseks kasutatakse ka kortikosteroide, mille efektiivsus sõltub sellest, kui edukalt suruvad need alla transkriptsioonifaktoritega reguleeritud allergilist põletikku (Kay, 2000). Sissehingatavad kortikosteroidid on hingamisteede põletiku allasurumises enamasti väga efektiivsed, kuid ei oma paljudel juhtudel olulist mõju suitsetavatele astmaatikutele (Chaudhuri, *et al.*, 2003). Kui ennetamine ei õnnestu, on astmahoogu võimalik lihaseid lõdvestavate bronhodilaatoritega leevendada. Bronhodilaatoreid on lühikese ja pikaajalise toimega. Lühikese toimeajaga bronhodilaator pakub kiiret leevendust astmahoole, kuid pikaajalise toimega ravimit kasutatakse sümptomite kontrollimiseks ja ennetamiseks (Cazzola, *et al.*, 2012).

Enamasti on astma puhul tegu allergiliste juhtumitega, kus iseloomulikeks tunnusteks võrreldes tervete inimestega, on interleukiinide ja kemokiinide ekspressiooni ning aktiveeritud T-rakkude hulga tõus. Th2-tüüpi tsütokiinide IL-5, IL-4 ja IL-13 ja teiste üldiste immunvastust stimuleerivate tsütokiinide granulootsüüt makrofaagi koloonia stimuleeriva faktori (GM-CSF - *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), IL-3, aktiveeritakse veres ringlevad eosinofiilid, mis seejärel migreeruvad kopsukoosse, kus need on võimelised kude nii kahjustama kui ka parandama. Kahjustamine toimub läbi reaktiivsete hapnikuühendite ja põletikku soodustavate tsütokiinide tootmise (Williams, 2004). Koe parandamine toimub tänu fibrogeensetele kasvufaktoritele ja matriksi metalloproteinaasile, millest mõlemad on astma korral seotud hingamisteede epiteelkoe remodelleerimisega (Levi-Schaffer, *et al.*, 1999).

Vastusena allergeenidele suureneb hingamisteede kudedes Th2 rakkudega toodetud tsütokiinide, sealhulgas IL-4, IL-5 ja IL-13 hulk. Need tsütokiinid suurendavad eosinofiilset põletikku ja IgE tootmist. IgE tootmine omakorda vallandab põletikuliste mediaatorite, näiteks histamiini, vabastamise, mis põhjustavad bronhiaalseid spasme ehk kokkutõmbeid, paistetust ja suurenenud lima sekretsiooni (Lemanske & Busse, 2010). IL-5 soodustab eosinofiilide ellujäämist, samal ajal kui IL-4 ja IL-13 indutseerivad kemokiinide vabastamist, limatootvate karikrakkude diferentseerumist, silelihaste muutusi ja teisi hingamisteede ülitundlikkust soodustavaid muutusi (Locksley, *et al.*, 2010).



## 1.2. Tsütokiinid allergilises astmas

Tsütokiinid on erinevate rakkude poolt toodetud väikesed signaalvalgud, mis reguleerivad organismi immuunvastuseid infektsioonidele, põletikule ja traumale (Pei, Bronietzki, & Gutierrez, 2012). Tsütokiin on üldine mõiste, mille alla kuuluvad monotsüütidega toodetud monokiinid, lümfotsüütidega toodetud lümfokiinid, leukotsüütidega toodetud interleukiinid, mis mõjuvad teistele leukotsüütidele ning kemokiinid, millel on kemotaktilised omadused. Kemokiinid jagunevad homeostaatilisteks ja põletikulisteks. Põletikuliste kemokiinide hulka kuulub näiteks CCL5, mida ekspresseeritakse T-rakkude ja paljude teiste rakkude aktivatsioonis (Moser & Loetscher, 2001). CCL5 on  $\beta$ -kemokiin, mis võimaldab põletikuvastaste leukotsüütide migratsiooni põletikusse koesse ja seda seostatakse nii allergilise põletiku kui ka mitteallergilise astmaga (Schuh, *et al.*, 2003). Üks kõige üldisemaid kemokiine, mida toodavad ka epiteeli rakud on IL-8, millel on mitmetele leukotsüütidele kemoatraktiivsed omadused, põhjustades nende rakkude migratsiooni põletikusse paika. Samuti võib IL-8 anda neutrofiilidele degranuleerimissignaali, mis patogeeni hävitamisel vigastab ka kude (Dinarello, 2000). IL-8 ja teiste üldiste põletikuliste tsütokiinide (IL-6 ja TNF- $\alpha$ ) tootmine hingamisteedes on iseloomulik neutrofiilsele põletikule ehk nn neutrofiilsele astma vormile. Neutrofiilse astma sümptomeid on raskem kontrollida võrreldes teiste astma vormidega (Wood, *et al.*, 2012).

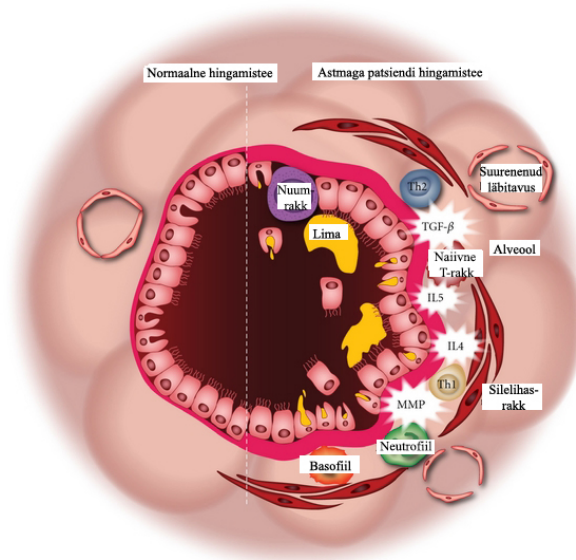
Th2 rakkudele on iseloomulik põletikku soodustavate IL-4, IL-5 ja IL-13 tootmine. Eelnevalt nimetatud tsütokiin toodetakse allergiliste haiguste puhul ja nad osalevad B-rakkude, nuumrakkude ja eosinofiilide aktivatsioonis. Nende hulgas B-rakud sekreteerivad IgE antikehasid (Deo, *et al.*, 2010).

## 1.3. Kopsuepiteelrakud ja nende roll astmas

Kopsuepiteelil, sealhulgas inimese bronhiaalsetel epiteeli rakkudel, on oluline mehhaaniline ja immunoloogiline kaitsefunktsioon organismi ja keskkonna vahel (Green, Huang, & Snoeck, 2013). Traheea ning bronhid on kaetud pseudokihilise epiteeliga, mille rakud paiknevad ühekihiliselt, kuid nende tuumad asuvad nii nagu mitmekihilisel epiteelil (Rock & Hogan, 2011; Morrissey & Hogan, 2010; Rawlins, *et al.*, 2009). Hingamisteede ühekihiline kuupepiteel (*Pseudostratified epithelium*) koosneb ripsrakkudest, karikrakkudest (*Goblet cells*), sekretoorsetest (*Clara*) rakkudest, neuroendokriinsetest rakkudest ja basaalarakkudest (Martinez-Anton, *et al.*, 2013; Green, Huang, & Snoeck, 2013; Hackett, *et al.*, 2011).

Alveoolides on kahte tüüpi epiteelrakke: alveolaarepiteelrakk tüüp I ja II (ATI ja ATII). 95% alveolaarepiteelist on kaetud tüüp I rakkudega, mis on vajalikud gaasivahetuseks ning tüüp II rakud toodavad pinnaaineid, mis tagavad alveolaarse terviklikkuse, sisaldades lamellaarkehi (Rock & Hogan, 2011). Astma puhul on epiteelkiht nii alveoolides kui ka bronhides nõrgestatud ning vastuvõtlikum oksüdatiivsele stressile ja vigastustele (Lloyd & Saglani, 2010; Holgate & Polosa, 2008).

Hingamisteede epiteel on kaetud seda kaitsva limakihiga, mis seob patogeene ja ärritavaid ained ning mida on ripsepiteeli abil võimalik kopsust väljutada (Martinez-Anton, et al., 2013). Allergeeniga kokkupuutest tekkivat ülitundlikkusreaktsiooni püütakse leevendada läbi eosinofiilide ja basofiilide infiltratsiooni püsivamaks muutumise, nuumrakkude arvukuse suurenemise ja epiteelkoos asuvate karikrakkude limatootlikkuse suurenemise. Pikaajalise põletikulise olukorra tagajärjel pakseneb basaalkiht ja suureneb silelihaskoe mass (Locksley, et al., 2010). Astma korral esineb karikrakkude metaplaasia ehk karikrakkude hulga suurenemine, mis tekib, sest ripsrakud ja sekretoorsed Clara-rakud transdiferentseeruvad karikrakkudeks, põhjustades suurenenud lima sekretsiooni (Tyner, et al., 2006; Le Cras, et al., 2010). Suurenenud lima hulka võib pidada kompensatsiooniks vigase epiteelbarjääri puhul (Lambrecht & Hammad, 2012).



**Joonis 1. Normaalse ja astmaatilise hingamistee võrdlus.** Astmaatilise hingamistee puhul on näha märgatavaid struktuurseid muutusi, kaasa arvatud karikrakkude metaplaasiat. Modifitseeritud Shifren, et al., 2012 järgi.

Bronhiaalse epiteeli rakud ekspresseerivad paljusid patogeene äratundvaid retseptoreid (PRR, *pathogen recognition receptor*), mis on võimelised kiirelt detekteerima ja reageerima patogeenidega seotud molekulaarsetele mustritele (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*), mida seostatakse koe vigastuse, raku stressiolukorra või surmaga. PRR-ide aktivatsiooni korral vabanevad organismis tsütokiinid, kemokiinid ja antimikroobsed peptiidid, mis võimaldavad kaasasündinud kui ka omandatud immuunsüsteemil aktiveeruda (Lambrecht & Hammad, 2009; Lambrecht & Hammad, 2012). Kuna astmaga patsientide hingamisteedes asuvad epiteelrakud on altimad reageerima patogeenidega seotud PAMP-idele, põhjustab see tavalisest suurema immuunrakkude aktivatsiooni (Lee, Song, & Park, 2014).

#### 1.4. MikroRNA-d

MikroRNA-d on väikesed 19-25 nukleotiidi (nt) pikkused mittekodeerivad endogeensed RNA molekulid, mis reguleerivad transkriptsioonijärgset geeniekspressiooni. Need seonduvad märklaudgeeni mRNA 3' mittetransleeritavale alale (3'UTR, 3' *untranslated region*), põhjustades sellega otsese geeni vaigistamise (Hafner, *et al.*, 2010; Li, *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2009; Garofalo & Croce, 2011). Esimene mikroRNA avastati 1993. aastal *Caenorhabditis elegans*'il ja 7 aastat hiljem leiti, et miRNA-d on laialt levinud imetajate seas ning sealt alates on aastate jooksul leitud üha uusi miRNAsid (Berezikov, 2011; Xie, *et al.*, 2014). MiRBase andmebaasi järgi ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org), versioon 21) on inimese organismist leitud 2600 erinevat küpset miRNA-d mis jagunevad 239 erinevasse miRNA perekonda (Friedländer, 2014). MikroRNA-dega reguleeritakse enam kui 50% valku kodeeriva geeni ekspressiooni ning nende osalust on suudetud näidata väga erinevates bioloogilistes protsessides, sealhulgas rakkude arengu ja jagunemise kontrollimisel (Krol, Loedige, & Filipowicz, 2010).

MikroRNA-sid iseloomustab ühine biogeneesi rada ja toimemehhanism. Funktsionaalsed miRNA-d valmistatakse pikemaahelaliste mittefunktsionaalsete miRNA eellasmolekulide järkjärgulisel lõikamisel rakutuumas ja tsütoplasmas. MikroRNA-de primaarsed eellased (pri-miRNA-d) transkribeeritakse RNA polümeraas II poolt iseseisvatelt geenidelt või saadakse splaissingu käigus valku kodeerivate geenide intronitest (Lee, *et al.*, 2002). Pri-miRNA-dest lõigatakse rakutuumas välja üks või mitu juuksenõela-taolist prekursor miRNA-d (pre-miRNA), mis omakorda transporditakse tsütoplasmasse, kus pre-miRNA-st lõigatakse välja üks kaheaahelaline miRNA dupleks (Lee, *et al.*, 2003). Kahest dupleksi ahelast on funktsionaalne enamasti vaid üks ja teine lagundatakse (Krol, Loedige, & Filipowicz, 2010).

Ahelate eraldumine ja funktsionaalse ahela valik toimub siis, kui dupleks seondub ühega Argonaut perekonna valkudest, milleks on enamasti Argonaut-2 (AGO2) (Khvorova, Reynolds ja Jayasena, 2003). MikroRNA seondumine sihtmärkgeeniga toimub läbi 6-8 nukleotiidsete järjestuste, mis on omavahel osaliselt või täielikult komplementaarsed. miRNA-del on selleks 5' otsast lugedes 2.-9. positsioonil asuvad nukleotiidid, mida kutsutakse miRNA seemnejärjestuseks (*seed sequence*). Sihtmärkgeenidel on selleks 3'UTR-is asuvad miRNA seondumissaidid (Lewis, *et al.*, 2003). MikroRNA-vahendatud geeniekspressiooni regulatsioon saab toimuda, kui miRNA-AGO2 kompleks värbab täiendavaid valke ning moodustatakse miRNA-indutseeritud vaigistav kompleks (miRISC – *miRNA induced silencing complex*). miRISC-i seondumine märklaud mRNA-ga kutsub esile translatsiooni allasurumise või indukseerib mRNA degradatsiooni läbi deadenütsiooni initsiatsiooni (Gu, *et al.*, 2009). Lühikese seondumisala ja sellest tulenevalt piiratud arvu võimalike nukleotiidsete järjestuste kombinatsioonide tõttu võib üks miRNA reguleerida sadu geene, samas võivad ühte geeni mõjutada ka mitu erinevat miRNA-d (Baek, *et al.*, 2009; Sonenberg, 2012). MiRNA-de mõjutused üksikutele sihtmärkgeenidele võivad olla väikesed või koguni märkamatud, kuid tihti reguleeritakse samast signaalrajast korraga mitut geeni ning tugevam efekt tuleb välja terviklikku signaalrada või kaudseid allavoolu sihtmärke silmas pidades (Rebane, 2013). MikroRNA-d on RNAasi-rikas keskkonnas väga stabiilsed, sest neid kaitseb degradatsiooni eest seondumine Argonaut-2 valguga või on miRNA-d kapseldatud vesiikulisse (Février & Raposo, 2004; Arroyo, *et al.*, 2011).

#### **1.4.1. MikroRNA-d immuunsüsteemi regulaatoritena**

MikroRNA-de võime mõjutada korraga paljude geenide ekspressiooni või koguni signaalradu, teeb neist head potentsiaalsed immuunsüsteemi regulaatorid. Viimastel aastatel on paljud uurimused leidnud sellele kinnitust ning praeguseks on teada mitmeid miRNA-sid, mille ekspressioon suureneb koos immuunfunktsioonide aktiveerimisega ning mis võimendavaid või ka vaigistavaid immuunvastuseid.

2009. aastal, Malumbres'i poolt avaldatud töös leiti, et miR-125b osaleb B-rakkude diferentseerumise regulatsioonis. miR-125b üleekspressioonil suruti alla selle märklaudgeene, interferooni regulaatorfaktor 4 (IRF4) ja PR-domääni tsinksõrme proteiin-1 (PRDM1), mis on vajalikud B-rakkude diferentseerumiseks (Malumbres, *et al.*, 2009). On ka teisi miRNA-sid, mis reguleerivad B-rakkude diferentseerumist ja nende funktsioone, näiteks miR-181a ja miR-181b. miR-181a osaleb B-rakkude arengus ning miR-181b osaleb isotüübi vahetuse

reaktsioonis. Isotüübi vahetus on bioloogiline mehhanism, läbi mille toimub B-rakkude antikehade tootmise muutus ühest tüübist teise, näiteks immunoglobuliin (Ig)-M läheb üle IgG-ks (Chen, *et al.*, 2003; Yébenes, *et al.*, 2008; Li, *et al.*, 2013). Väga hästi iseloomustab miRNA-de osavõttu B-rakkude vahendatud immuunsuses miR-155, mille deletsioon põhjustab defektid adaptiivses immuunsuses (Rodriguez, *et al.*, 2007; Thai, *et al.*, 2007).

Igal IG alamklassil on erinev funktsioon seoses erinevate antikehade sisaldusele. Näiteks IgG1 ja IgG3 alamklassid suudavad ära tunda difteeria ja teetanuse bakterite toodetud toksine, samal ajal kui IgG2 antikehad tunnevad ära polüsahhariidsetele kapslitele spetsiifilised antigeenid. Seetõttu võib IgG2 ja ka IgG4 antikehade puudus organismis põhjustada suurenenud haigestumisvõimaluse polüsahhariidse kapsliga bakteritega (Vidarsson, Dekkers, & Rispens, 2014). Kui organismis on miR-155 puudus, ei suuda B-rakud toota kõrge spetsiifilisusega IgG1 antikehasid, mis moodustavad seerumis suurema osa antikehadest. Sellisel juhul võib IgG1 antikehade puuduse korral valitseda organismis üldine IgG antikehade defitsiit, mis muudab organismi vastuvõtlikumaks infektsioonidele (Jefferis & Kumararatne, 1990).

miR-155 on ainuke teadaolev miRNA, mis osaleb CD4<sup>+</sup> T-rakkude alamrühmade reguleerimises funktsioonides. Selle miRNA puuduses kalduvad CD4<sup>+</sup> T-rakud Th1 asemel Th2 diferentseerumise poole, mille tõttu toodab organism rohkem põletikku reguleerivaid tsütokiine, näiteks IL-4, IL-5 ja IL-10 ning see annab alust arvata, et miR-155 mõjutab CD4<sup>+</sup> T-rakkude jagunemist (Rodriguez, *et al.*, 2007; Banerjee, *et al.*, 2010). Suurenenud miR-155 tase võib viidata, et CD4<sup>+</sup> Th-rakud ei kutsu esile ainult raku proliferatsiooni, vaid muudab CD4<sup>+</sup> Th-rakud tundetuks reguleerivate T (T-reg) rakkude poolt esile kutsutud vaigistamisele. Suurenenud miR-155 tase ei tohiks mõjutada T-reg rakkude tootmise alla surumist (Stahl, *et al.*, 2009).

Omandatud immuunvastuse jooksul aktiveerib T-raku retseptor (TCR, *T-cell receptor*) antigeeniga kokkupuutel kolme peamist transkriptsioonifaktorit: aktivaator proteiin-1 (AP-1), tuumafaktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, *Nuclear factor kappa B*) ja aktiveeritud T-rakkude tuumafaktorit (NFAT, *Nuclear factor of activated T-cells*), mis on kõik seotud tsütokiinide tootmisega. TLR-i aktivatsioon viib transkriptsioonifaktorite AP-1 ja NF- $\kappa$ B aktivatsioonini, mis omakorda põhjustavad mitmete immuunvastustega seotud geenide ülesregulatsiooni (Taganov, *et al.*, 2006). T-rakkude aktivatsioonil suurenenud miR-146a sekreteerimine võib

aga takistada AP-1 ja IL-2 tootmist, reguleerides seeläbi omandatud immuunsüsteemi (Curtale, *et al.*, 2010). Vigane miRNA ekspressioon immuunsüsteemis võib põhjustada põletikulisi haigusi, autoimmuunhaigusi ning vähki (Gracias & Katsikis, 2011).

#### **1.4.2 MikroRNA-d astmas**

MiR-21 on üks enim uuritud mikroRNA-sid, mille muutunud ekspressioon on iseloomulik paljudele vähi vormidele ja millel on näidatud mitmeid funktsioone ka immuunsüsteemis (Sicard, *et al.*, 2013). Lu ja kolleegide 2009. aastal sooritatud katsetes leiti, et miR-21 ekspressiooni tase on kõrgem kolmes erinevas hiire astmamudelil milleks olid – ovalbumiini (OVA), *Aspergillus fumigatus*-e ja IL-13 poolt indutseeritud astma (Lu, Munitz, & Rothenberg, 2009). Teises uuringus, sooritatud Wu ja kolleegide poolt 2014. aastal leiti, et sõltumata astma ravist, toimus astmaatiliste doonorite bronhiaalsetes epiteeli rakkudes IL-13 vahendatud miR-21 ja miR-126 ekspressioonitaseme ülesregulatsioon (Wu, *et al.*, 2014). On näidatud, et miR-21 inhibeerib IL-12 ekspressiooni, mis muudab Th1/Th2 tasakaalu. Kui IL-12 hulk jääb organismis väikeseks, siis Th2-tüüpi immuunvastus tugevneb (Holtzman, *et al.*, 2002).

MiR-155 on mikroRNA, mida lisaks astmale seostatakse veel väga paljude füsioloogiliste ja patoloogiliste muutustega, kaasa arvatud põletikud, vähk, kardiovaskulaarsed haigused ja viiruslikud infektsioonid (Faraoni, Antonetti, Cardone, & Bonmassar, 2009). Martinez-Nunez 2014. aasta uurimus näitas, et astmaatilise doonori kopsuepiteeli rakkudes toimus miR-155 allaregulatsioon, mis üleekspressioneerudes võimendab põletikku. Kuna miR-155 otsesed märklauad on JAK-STAT (*Janus kinase - signal transducer and activator of transcription*) ja NF- $\kappa$ B signaaliradade inhibiitorid, siis selle mikroRNA ekspressiooni inhibeerimine põhjustab põletiku ja koe ümberkujundamisega seotud tsütokiinide IL-6 ja IL-8 ekspressiooni taseme kasvu. IL-6 ja IL-8 taseme kasv suurendab astmaatilise doonori bronhiaalse epiteeli koes põletikku (Martinez-Nunez, *et al.*, 2014).

#### **1.5. MikroRNA-146 perekond**

miR-146 perekond koosneb kahest liikmest: miR-146a ja miR-146b, mis kodeeritakse erinevatelt kromosoomidelt ja mille järjestused erinevad 3' regioonil kahe nukleotiidi osas (Joonis 2). miR-146a/b on seotud ka infektsioonide ja põletikuliste haigustega (Esteller, 2008; Hou, *et al.*, 2009; Nakasa, *et al.*, 2009; Kutty, *et al.*, 2013).

miR-146a 5' – UGAGAACUGAAUCCAUAAGGCU – 3'

miR-146b 5' – UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU – 3'

**Joonis 2. MiR-146a ja miR-146b järjestused.** Punasega on märgitud miR-146a/b vaheline nukleotiidne erinevus.

Lipopolüsahhariidide (LPS) seondumine TLR-idele põhjustab NF-κB signaaliraja aktivatsiooni ja see stimuleerib miR-146a ekspressiooni (Bhaumik, *et al.*, 2008; Xie, *et al.*, 2014). miR-146 perekonna ühtedeks otsesteks märklaudadeks on IRAK1 ja TRAF6 (Taganov, *et al.*, 2006). miR-146b ekspressiooni stimuleeritakse läbi c-jun N-terminal kinaas (JNK), p38 mitogeeni aktiveeritud kinaas (MAP) ja JAK-STAT radade kaudu (Perry, *et al.*, 2009; Kutty, *et al.*, 2013). Organismis aktiveeritakse NF-κB rada juhul, kui tegemist on mikroobsete või viiruslike infektsioonidega ning kui toodetakse põletikku soodustavaid tsütokiine, nagu näiteks TNF-α (Li, *et al.*, 2011). TRAF6 ja IRAK1 paiknevad NF-κB raja alguses. miR-146a põhjustab nende molekulide vaigistamist ja selle tagajärjel inhibeeritakse NF-κB aktivatsioon ning väheneb immuunvastus põletikule (Bhaumik, *et al.*, 2008). Samuti on leitud, et miR-146a inhibeerimine põhjustab suurenenud IL-8 ja CCL5 ekspressiooni taseme, kuid miR-146b inhibeerimisel muutust ei toimunud (Perry, *et al.*, 2008).

Teadaolevalt käitub miR-146a/b negatiivse põletiku regulaatorina, kuna vähendab põletikku soodustavate tsütokiinide sekreteerimist. Tsitsiou 2011. aasta uuring võrdles miRNA-de ekspressiooni astmaatilise doonori CD4<sup>+</sup> ja CD8<sup>+</sup> T-rakkudes, mille tulemusel näidati, et miR-146a ekspressiooni tase oli raskekujulise astma korral vähenenud patsientidel, kes kasutasid raviks süsteemseid kortikosteroide (Tsitsiou, *et al.*, 2011).

Comer et al. 2014. aasta töös avaldatud tulemused näitasid, et stimuleerides inimese hingamisteede silelihaste rakke tsütokiinidega IL-1β, TNF-α, ja IFNγ, toimub miR-146 perekonna ülesregulatsioon. miR-146a/b reguleerivad negatiivselt tsüklooksügenaas-2 (COX-2) ja IL-1β ekspressiooni. Seetõttu võib arvata, et miR146a/b reguleerib põletikulisi protsesse hingamisteede silelihastes, osaledes seeläbi astma tekkes (Comer, *et al.*, 2014). Xiang et al. 2014. aastal läbiviidud uuringus soovisid nad teada saada, millised miRNA-d võivad olla reguleeritud STAT3 raja poolt. STAT3 rada osaleb raku proliferatsioonis ja angiogeneesis, mis võimaldavad kasvaja arengu teket. Nad leidsid, et miR-146b ekspressioon suureneb STAT3 signaaliraja aktivatsioonil ning miR-146b puudusel suureneb kasvaja tekke võimalus põletikulises olukorras (Xiang, *et al.*, 2014).

## **2. EKSPERIMENTAALOSA**

### **2.1. Töö eesmärgid**

Käesoleva bakalaureusetöö eksperimentaalse osa eesmärgiks oli uurida, kuidas mõjutavad erinevad põletikulised tsütokiinid miR-146a ja miR-146b ning nende mikroRNA-de poolt mõjutatavate geenide CCL5 ja IL-8 ekspressiooni inimese primaarsetes bronhiaalsetes epiteeli rakkudes.

### **2.2. Materjal ja metoodika**

#### **2.2.1. Kasutatud rakuliinid ja söötmed**

Eksperimentides kasutati primaarseid HBEC rakke B126, B113 ja B87, mis saadi kingituseks koostööpartneritelt (Dr. B. Jakiela, Jageilloni Ülikool, Krakow, Poola). B126 rakud pärinesid naissoost astmahaigelt doonorilt, kelle vanus oli 63 eluaastat. B113 rakud pärinesid meessoost tervelt doonorilt, kelle vanus oli 26 eluaastat ja B87 rakud pärinesid tervelt meessoost doonorilt, kes oli kolmekümnendates eluaastates.

Rakke kasvatati Clonetics™ BEGM™ BulletKit™ CC-3170 (BEGM – *Bronchial Epithelial Cell Growth Medium*) söötmes (Lonza Group Ltd, Šveits), mida vahetati ülepäeviti, nädalavahetusel jäeti sööde peale kaheks päevaks. Rakke kasvatati koekultuuri inkubaatoris, kus oli 5% CO<sub>2</sub>-te, temperatuur 37°C ning keskkond küllastatud veeauruga. Sööde oli seerumi vaba, kuid sisaldas epinefriini (1:20), transferiini (1:20), insuliini (1:20), retinoolhapet (1:20), hüdrokortisooni (1:20), inimese epidermaalne kasvufaktor (hEGF) (1:20), trijoodtrüoniin (1:20), gentamütsiin ning amfoteritsiin-B (GA) (1:20) ja veise ajuripatsi ekstrakt (BPE, *Bovine Pituitary Extract*) (1:5). Nende komponentide kontsentratsioonid on tootja poolt salastatud. Rakke kasvatati 6 ja 10 cm läbimõõduga koekultuuri tassidel. Tsütokiinidega stimuleerimisel jäid rakkude passaažid vahemikku kolm kuni viis.

#### **2.2.2. HBE rakkude kasvatamine ja stimuleerimine**

Stimuleerimiseks jagati rakud enne stimuleerimise algust 12- või 24-kannustel plaatidele. Selleks võeti HBE rakkudelt sööde pealt, pesti 10 cm läbimõõduga plaati 5 ml PBS-iga (fosfaadiga puhverdatud soolalahus, *Phosphate Buffered Saline*). Seejärel pandi plaadile 2 ml



1xTrüpsiini (Invitrogen, USA) ja rakke inkubeeriti 37°C juures 4-7 minutit, et rakud vabaneksid plaadilt. Trüpsiini neutraliseerimiseks lisati kahekordses koguses ehk 4 ml Trüpsiini neutraliseerijat (Trypsin Neutralizer, Lonza Group Ltd, Šveits). Rakud koguti 15 ml tuubi, loputades plaati lisaks 5 ml PBS-iga, et saada kõik rakud kätte. Rakke tsentrifuugiti 250 rcf 4°C juures 7 minutit (Eppendorf 5424 R, FA-45-24-11 rootor, Saksamaa). Seejärel eemaldati supernatant, lisati 10ml BEGM söödet ja suspendeeriti rakke vähemalt 10 korda. Rakud jaotati 500 µl lahuse kaupa kannudele. HBE rakkude stimulatsioonid toimusid tsütokiinidega: IL-17A (lõppkontsentratsiooniga 20 ng/ml, eBiosciences, USA), TNF-α (20 ng/ml, Biolegend, USA), IL-1β (10 ng/ml, Peprotech, UK), IL-4 (10 ng/ml, Peprotech, UK), IL-13 (50 ng/ml Peprotech, UK), IFN-γ (20 ng/ml, eBiosciences, USA) ja IFN-α2a (20 ng/ml, Peprotech, UK) 24 tunni möödudes pärast plaadile külvamist. Stimulatsioon toimus 48 tundi või 8, 24, 48 ja 72 tundi. Pärast stimuleerimist eraldati rakkudest totaalne RNA.

### 2.2.3. RNA eraldamine

RNA eraldamiseks kasutati *miRNeasy Mini Kit* komplekti (Qiagen, GmbH, Saksamaa) ja *Direct-zol™ RNA MiniPrep* komplekti (Zymo research, USA). Vastaval ajapunktil sööde eemaldati ning rakud homogeniseeriti 500 µl *QIAzol Lysis Reagent*-iga (Qiagen, Saksamaa). Lüsaat koguti 1,5 ml tuubidesse ja seejärel lisati 110 µl kogust kloroformi (AppliChem, Saksamaa) ning tuube loksutati 15 sekundit, inkubeeriti toatemperatuuril 3 minutit ja fuugiti 12 000 rcf 15 minutit 4°C juures (Eppendorf 5424 R, FA-45-24-11 rootor, Saksamaa). et tekiks kolm, selgelt eristatavat kihti – vesikiht, kus on RNA, interfaas mis sisaldab genoome DNA-d ja denatureerinud valke ja roosakas orgaanika kiht. Seejärel eraldati vesifaas, mis tõsteti ettevaatlikult uude tuubi, kus sellele lisati 1,5x ruumala 100% etanooli (Naxo, Eesti), segu segati Vortex-il (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, USA) ja tõsteti kolonnidesse, järgnevalt tsentrifuugiti 15 sekundit (s) 8000x rcf juures, läbivool valatati ära.

Kolonnile lisati 700 µl puhverlahust (Buffer RW1) ning tsentrifuugiti 15 s 8000x rcf juures, läbivool eemaldati. Järgnevalt toimus 2 pesu korda 500 µl pesupuhvriga (Buffer RPE), millest esimesel korral tsentrifuugiti 15 s 8000x rcf juures ning teine kord 2 minutit 8000x rcf juures. RNeasy kolonn pandi uude 2 ml kogumistuubi ja seda tsentrifuugiti veel 1 minut, et membraan oleks täiesti kuiv. Seejärel tõsteti RNeasy kolonnid puhastesse 1,5 ml kogumistuubidesse ja lisati 50 µl RNAasi vaba vett täpselt membraanile. Tuubide kaaned suleti ning kolonnid jäeti jää peale 15 minutiks seisma, et suurendada RNA koguprodukti.

RNA elueerimiseks tsentrifuugiti kolonne 8000x rcf 1 minut toatemperatuuril. Eraldatud RNA säilitati -20 °C juures.

#### **2.2.4. RNA kontsentratsiooni mõõtmine**

Pärast RNA eraldamist mõõdeti RNA kontsentratsiooni ja puhtust NanoDrop 2000c spektrofotomeetriga (Thermo Scientific, USA). Mõõtmiseks kasutati 1 µl totaalselt RNA-d ning lahuse neeldumist mõõdeti 230, 260 ja 280 nm juures.

#### **2.2.5. miRNA spetsiifilise cDNA süntees**

Proovidest eraldatud RNA-st sünteesiti sellele komplementaarne DNA (cDNA) kasutades pöördtranskriptaasi reaktsiooni, *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit*'i (Life Technologies, USA) ja mikroRNA-de miR-146a, miR-146b ja Let-7a spetsiifilisi praimereid. Kogu süntees toimus jääl 96-kannuga plaadil. cDNA sünteesiks kasutati 2 µl RNA-d, mille kontsentratsioon oli 5 µg/ml ja lõppmahuks oli 6 µl. Reaktsiooni segu komponendid ja nende mahud 1x segus olid järgmised: 100 mM dNTP mix 0,028 µl, 10 x RT puhver 0,6 µl, *RiboLock RNA*asi inhibiitor 0,1 µl, 5x RT praimer 1 µl, vesi 2,07 µl ja 100 µM RT ensüümi. cDNA süntees toimus kasutades termotsüklerit Mastercycler® nexus (Eppendorf, Saksamaa). Sünteesi programmis toimus 16 °C juures 30 minutit praimeri seondumine, 30 minutit 42 °C juures, kus aktiveeritakse ensüüm ja toimub cDNA süntees, 10 minutit 85 °C juures, et inaktiveerida ensüüm. Sünteesitud cDNA kasutati kas koheselt pärast sünteesi või säilitati -20 °C juures.

#### **2.2.6. Kvantitatiivne reaal-aja PCR (qPCR) miRNA-de suhtelise ekspressiooni määramiseks**

Kvantitatiivset reaal-aja PCR-i kasutati miRNA-de suhtelise ekspressiooni leidmiseks. Sünteesitud proovidele 96-kannuga plaadil kanti peale 17 µl reaktsioonisegu, mis koosneb 4,4 µl 5x *Hot Firepol probe qPCR* segu, 11,6 µl veest, 1 µl 20x *TaqMan miRNA assay* ja 6 µl cDNA-st, lõppruumalaga 23 µl. See lahus pipeteeriti 10 µl kaupa 384-kannuga plaadile. Kõiki proove mõõdeti kahes korduses ning kontrolliks oli koduhoidja let-7a. Kvantitatiivseks PCR-iks kasutati 7900 HT Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems, USA) masinat. Sünteesi programm oli järgmine: 95 °C juures 15 minutit toimus ensüümi aktiveerimine.

Järgmisena toimus 15 sekundit 95°C juures denaturatsiooni etapp, mille jooksul lõhutakse DNA nukleotiidide vahelised vesiniksidemed, tekitades üksikahelalised DNA molekulid. 60°C juures toimus ekstensiooni etapp, mille käigus sünteesib polümeraas uue DNA ahela. Viimasel kahel etapil oli 40 tsüklikordust.

### 2.2.7. mRNA spetsiifilise cDNA süntees

cDNA süntees viidi läbi kasutades termotsüklerit Mastercycler® nexus. cDNA sünteesiks segati jääl hoides kokku 11,5 µl RNA, 1 µl oligo dT ja 2 µl dNTP. Seejärel kuumutati segu 65 °C juures. 65 °C juures kuumutamine on vajalik, et eemaldada RNA sekundaarstruktuurid. Järgmiseks lisati proovidele 4 µl RT puhvri, 1 µl ensüümi (*RevertAid Reverse Transcriptase*, Thermo Scientific, USA) ja 0,5 µl RNAasi inhibiitori segu. Reaktsioon toimus 96-kannuga plaadil 60 minutit 42 °C juures, 10 minutiga 75 °C juures peatati reaktsioon ning edasi hoiti proove 20 °C juures. Sünteesitud cDNA kasutati koheselt või säilitati -20 °C juures.

### 2.2.8. qPCR mRNA-de suhtelise ekspressiooni määramiseks

Pärast cDNA sünteesi kasutati sihtmärkgeenide ekspressioonitaseme mõõtmiseks 7900 HT Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems, USA) masinat, mille reaktsiooniprogramm on järgmine: 95 °C juures toimub algne denaturatsioon, mis kestab 15 minutit, sellele järgneb 95 °C juures denaturatsioon, mida toimub 15 sekundit, praimer seondumine toimub 60 °C juures 20 sekundit ja elongatsioon 72 °C juures. Viimast kolme etappi korrati 40 tsükli. Kvantitatiivseks PCR-iks kasutati 2,4 µl 5x *HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR* segu (Solis Biodyne, Eesti), 1 µl 4 µM *F (Forward) +R (Reverse)* praimerite segu, 2,6 µl deioniseeritud vett ja 6 µl eelnevalt sünteesitud cDNA-d. Proovid mõõdeti kolmes korduses 384-kannuga plaadil. Käesolevas töös kasutatud primerite järjestused on toodud Tabelis 1.

**Tabel 1. Kasutatud praimerid**

CCL5	<i>F</i>	AGTCGTCTTTGTCACCCGAAA
	<i>R</i>	TCTCCATCCTAGCTCATCTCCAA
IL-8	<i>F</i>	GCAGCTCTGTGTGAAGGTGCAGTT
	<i>R</i>	TTCTGTGTTGGCGCAGTGTGGTC
EF1A	<i>F</i>	CCACCTTTGGGTCGCTTTGCTGT
	<i>R</i>	TGCCAGCTCCAGCAGCCTTCTT

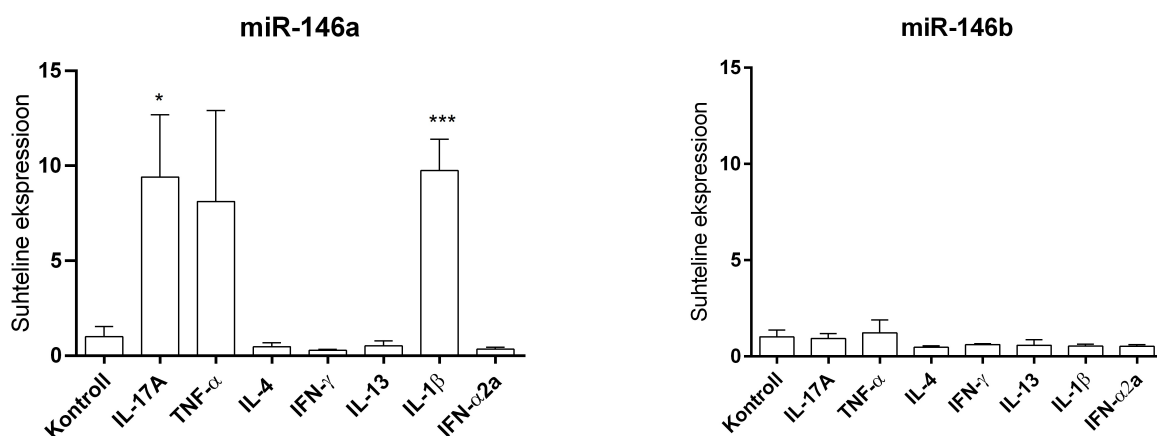
### 2.2.9. Reaal-aja qPCR-i andmete analüüs

Reaal-aja qPCR-i tulemusi analüüsiti kõigepealt SDS 2.4. (Applied Biosystems) programmi abil. Nii mRNA kui ka miRNA-de ekspressiooni tulemusi võrreldi lävitsükli ( $C_T$  – *Threshold cycle*) põhjal, mis põhineb fluorestsentssignaali intensiivsuste erinevustel uuritava ja kontrollproovi vahel. Ekspressiooni tulemuste võrdluse arvutamiseks kasutati  $C_T$  kalkulaatorit, mis põhineb mRNA/miRNA lävitsükli ja koduhoidja tulemuste suhteliste väärtust erinevuse leidmisel.  $C_T$  kalkulaatori valem, millega suhteline väärtus leiti, oli järgmine:  $2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(C_T^{\text{märklau}} - C_T^{\text{EF1A}_{\text{proov}}} - (C_T^{\text{märklau}} - C_T^{\text{EF1A}_{\text{kontroll}}})}$ , kus  $C_T$  on lävitsükk. Lisaks normaliseeriti kõik tulemused kontrollväärtuste keskmise suhtes, mis võrdsustati ühega. Andmete esitamiseks ja statistiliseks analüüsiks kasutati GraphPadi Prism 6 (GraphPad Software Inc, USA). Statistiliseks analüüsiks võrdlemaks erinevatel tingimustel saadud väärtusi kasutati T-testi (*Unpaired T-test*). P-väärtust, mis oli väiksem kui 0,05 ( $P < 0,05$ ), loeti statistiliselt oluliseks. Kui sooviti analüüsida rohkem kui kahte väärtuste rida, kasutati selleks rühma analüüsi (*Group analyses*) ja kahesuunalist ANOVA testi (*Two-way ANOVA*) koos Bonferroni parandusega.

## 2.3. TULEMUSED

### 2.3.1. miR-146a ja miR-146b ekspressioon inimese primaarsetes bronhiaalsetes epiteeli rakkudes

Et uurida, kas erinevad põletikuliste protsessidega seotud tsütokiinid võivad mõjutada miR-146a ja miR-146b ekspressiooni HBEC rakkudes astma korral, stimuleeriti primaarseid HBEC rakke 48 tundi järgnevate tsütokiinidega: IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-13, IFN- $\gamma$  ja IFN- $\alpha$ 2a. Tuvastati miR-146a ekspressiooni ülesregulatsioon IL-17A ja IL-1 $\beta$  stimulatsiooni toimet vastavalt 9,4 ja 9,8 korda võrreldes mittestimuleeritud rakkudega. Samuti toimus TNF- $\alpha$  stimulatsiooniga miR-146a 8-kordne ülesregulatsioon, kuid see oli suure katsevea tõttu statistiliselt mitteoluline. miR-146b ekspressioonis kasutatud tsütokiinidega muutusi ei täheldatud (Joonis 3).

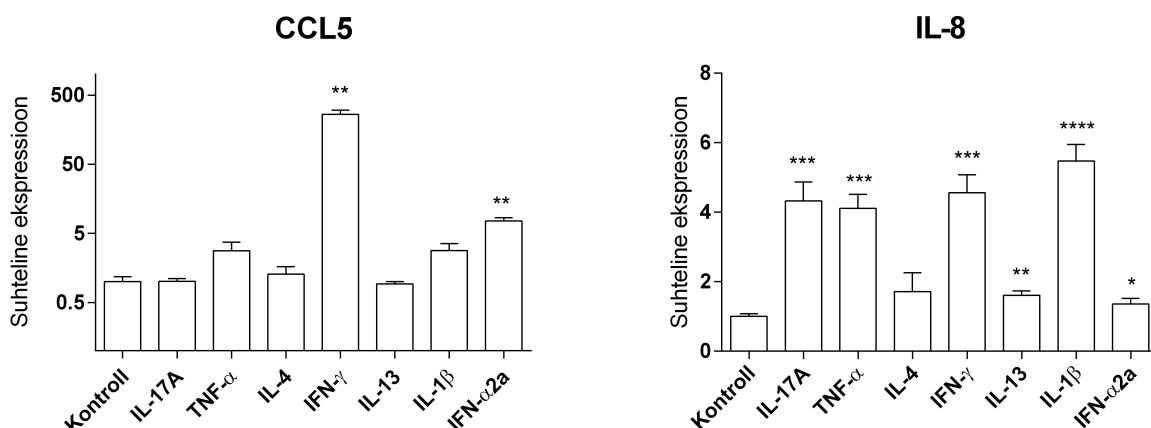


**Joonis 3. miR-146a ja miR-146b ekspressioon HBEC rakkudes.** miRNA-de suhteline ekspressioon tuvastati RT-qPCR meetodil, katsetes kasutati terve doonori HBEC rakke. Tulemused on mõõdetud 48 tundi pärast stimulatsiooni algust ning normaliseeritud koduhoidja let-7a miRNA ekspressiooni tasemete ja stimuleerimata kontrolli (=1) suhtes. Näidatud on kolme samal ajal tehtud erineva stimulatsiooni tulemuste keskmised väärtused ja nende standardviga. \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

### 2.3.2. miR-146a ja miR-146b otsese ja kaudse märklaua CCL5 ja IL-8 ekspressioon HBEC rakkudes

Varem on näidatud, et TNF- $\alpha$  ja IL-1 $\beta$  põhjustavad CCL5 ja IL-8 ekspressiooni tõusu ning IL-4 ja IL-13 CCL5 ekspressiooni langust primaarsetes HBEC ja kopsu silelihasrakkudes (John, *et al.*, 1997; Kwon, *et al.*, 1995; Standiford, *et al.*, 1990). Et kontrollida, kas joonis 3

esitatud katsetes HBEC rakkude stimulatsioon töötas, analüüsisime samadest rakkudest eraldatud RNA proovidest ka CCL5 ja IL-8 mRNA ekspressiooni tasemeid (Joonis 4). IFN- $\gamma$  põhjustas 264 kordse ning IFN- $\alpha$ 2a 7,6 kordse kõrgeenenud CCL5 ekspressiooni võrreldes mittestimuleeritud rakkudega. miR-146a/b kaudse märklaua IL-8 avaldumise tase oli kõrgem enamiku kasutatud tsütokiinide puhul: ekspressiooni tõus IL-1 $\beta$  toimel oli 5,5 kordne, IL-17A-ga 4,3 kordne, IFN- $\gamma$ -ga 4,6 kordne, TNF- $\alpha$ -ga 4,1 kordne, IL-13-ga 1,6 kordne ja IFN- $\alpha$ 2a-ga 1,4 kordne.

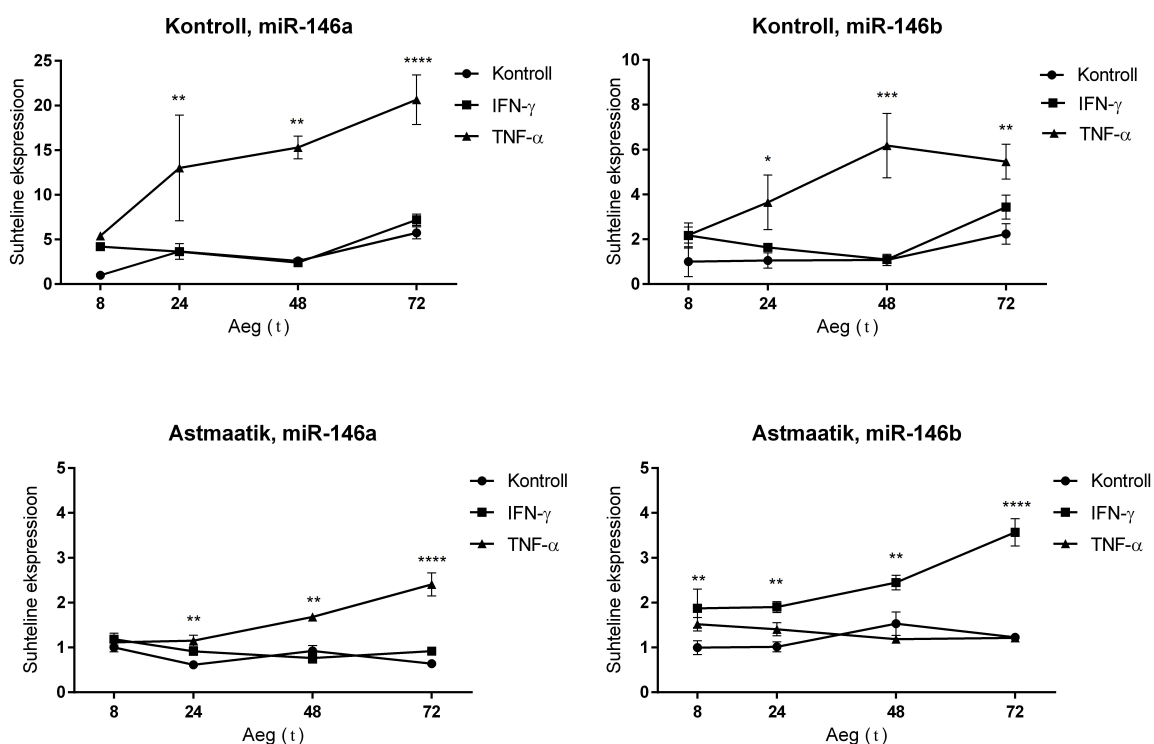


**Joonis 4. CCL5 ja IL-8 suhteline ekspressioon HBEC rakkudes.** CCL5 ja IL-8 suhteline ekspressioon tuvastati RT-qPCR meetodil. Katsetes kasutati terve doonori HBEC rakke. Tulemused on mõõdetud 48 tundi pärast stimulatsiooni algust ning normaliseeritud koduhoidja EF1A mRNA ekspressiooni taseme ja stimuleerimata kontrolli (=1) suhtes. Näidatud on kolme samal ajal tehtud erineva stimulatsiooni tulemuste keskmised väärtused ja nende standardviga. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

### 2.3.3. miR-146a ja miR-146b ekspressiooni võrdlus kontrolldoonori ja astma patsiendi HBEC rakkudes IFN- $\gamma$ ja TNF- $\alpha$ stimulatsioonis

Mitmetes varasemates töödes on näidatud, et astma haigete ja tervete doonorite bronhiaalsetes epiteeli rakkudes on erinevused geeniekspressiooni mustrites (Woodruff, *et al.*, 2009; Wagener, *et al.*, 2013). Samuti on leitud, et astma haigetelt pärinevad HBEC rakud käituvad teisiti võrreldes tervetest doonoritest pärinevate rakkudega koekultuuri tingimustes (Edwards, *et al.*, 2012). Seetõttu soovisime oma katsetes näha, kas esineb erinevusi miR-146a/b ekspressiooni tasemetes tervete ja astmaatiliste doonorite HBEC rakkudes, kui viia läbi stimulatsioonid IFN- $\gamma$ -ga, mis eeldatavalt võiks mõjutada miR-146b ekspressiooni taset ja TNF- $\alpha$ -ga, mis stimuleeris miR-146a ekspressiooni joonisel 3 näidatud katses. Stimulatsiooni katsed tehti kas 8, 24, 48 või 72 tundi (Joonis 5). Kui võrrelda terve doonori HBEC rakkude

miR-146a ekspressiooni taset astma haigest pärinevate rakkude miR-146a ekspressiooniga, leiti et mõlemal juhul toimus miR-146a ülesregulatsioon TNF- $\alpha$  stimulatsioonis, kuid terve doonori rakkudes oli miR-146a ekspressiooni stimulatsioon tugevam: 13, 15,3 ja 20,6 korda ajapunktides 24, 48 ja 72 tundi vastavalt. Astmaatilise doonori HBEC rakkudes suurendas TNF- $\alpha$  samades ajapunktides miR-146a ekspressiooni vastavalt 1,2, 1,7 ja 2,4 korda. miR-146b ekspressiooni tase oli kõrgem terve doonori HBEC rakkudes TNF- $\alpha$  stimulatsiooni toimele 3,6, 6,2 ja 5,5 korda ajapunktides 24, 48 ja 72 tundi, võrreldes mittestimuleeritud rakkudega. Astmaatilise doonori rakkudes oli näha miR-146b ekspressiooni stimulatsioon IFN- $\gamma$  toimele kõikides ajapunktides ning see oli kõige suurem 72 tunni ajapunktil (3,6 korda).

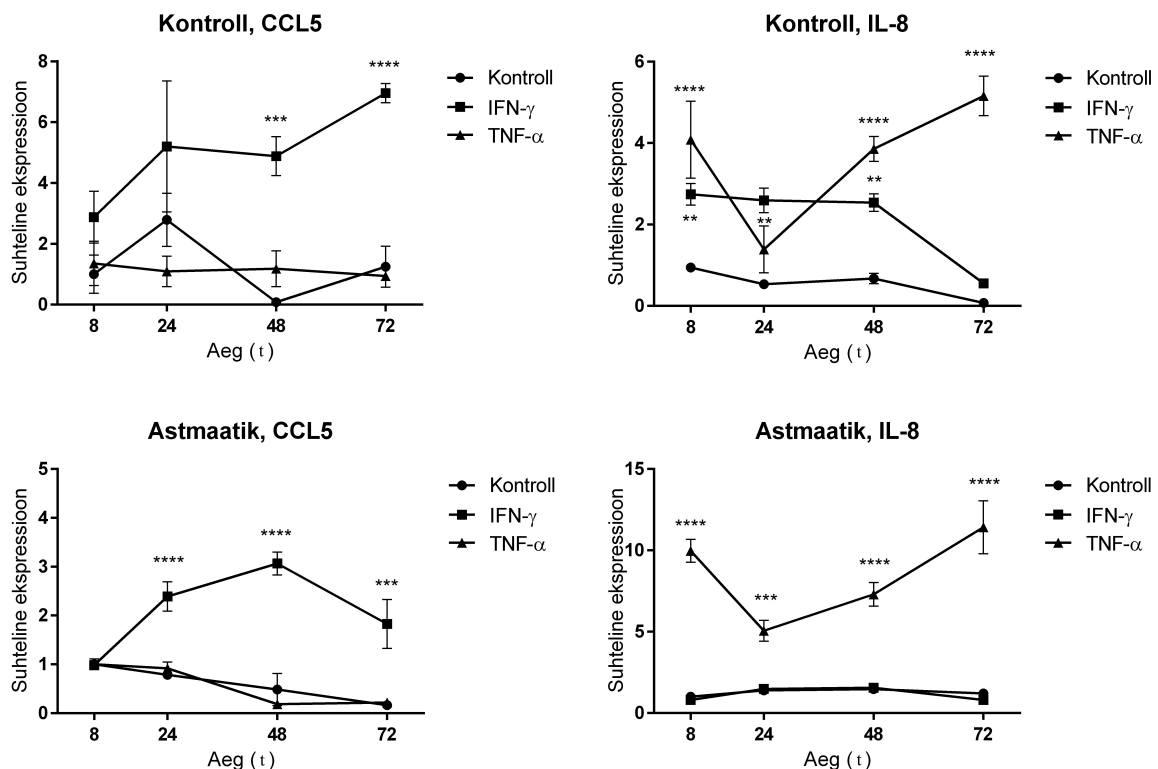


**Joonis 5. miR-146a ja miR-146b suhtelise ekspressiooni võrdlus kontrolldoonori ja astma patsiendi HBEC rakkudes.** Suhteline miRNA ekspressioon tuvastati RT-qPCR meetodil joonisel näidatud ajapunktides, normaliseeriti koduhoidja EF1A ning stimuleerimata kontrolli (=1) suhtes ajapunktis 8 tundi. Näidatud on kolme samal ajal tehtud erineva stimulatsiooni tulemuste keskmised väärtused ja nende standardviga. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$

#### **2.3.4. CCL5 ja IL-8 ekspressiooni võrdlus kontrolldoonori ja astma patsiendi HBEC rakkudes IFN- $\gamma$ ja TNF- $\alpha$ stimulatsioonil**

Järgneva katse abil sooviti kontrollida, kas IFN- $\gamma$  ja TNF- $\alpha$  stimulatsioonid primaarsetes HBEC rakkudes toimusid. Selleks analüüsiti joonisel 3 näidatud katse materjalist CCL5 ja IL-8 mRNA suhteline ekspressioon. Joonis 6 näitab, et nii terve doonori kui ka astma haige HBEC rakkude puhul toimus CCL5 ülesregulatsioon IFN- $\gamma$  stimulatsioonil. Terve doonori rakkudes oli CCL5 ekspressiooni stimulatsioon tugevam: 5,2, 4,9 ja 7 korda ajapunktides 24, 48 ja 72 tundi kui võrrelda mittestimuleeritud rakkudega. Astmaatilise doonori HBEC rakkudes suurendas IFN- $\gamma$  samades ajapunktides CCL5 ekspressiooni vastavalt 2,5, 3 ja 1,8 korda. IL-8 ekspressiooni tase oli terve doonori HBEC rakkudes TNF- $\alpha$  stimulatsiooni toimetel ülesreguleeritud vastavalt 4, 1,4, 3,9 ja 5,2 korda ajapunktides 8, 24, 48 ja 72 tundi võrreldes mittestimuleeritud rakkudega. IL-8 ekspressioonis toimus muutus ka IFN- $\gamma$  stimulatsioonil, mil toimus 2,7 ja 2,5 kordne ülesregulatsioon ajapunktides 8 ja 48 tundi. Astmaatilise doonori rakkudes on näha IL-8 ekspressiooni taseme suurenemist TNF- $\alpha$  stimulatsiooni toimetel 10, 5, 7,3 ja 11,4 korda ajapunktides 8, 24, 48 ja 72 tundi.





**Joonis 6. CCL5 ja IL-8 suhtelise ekspressiooni võrdlus kontrolldoonori ja astma patsiendi HBEC rakkudes.** miRNA ekspressioon tuvastati RT-qPCR meetodil joonisel näidatud ajapunktides. Tulemused normaliseeriti koduhoidja EF1A ning stimuleerimata kontrolli suhtes ajapunktis 8 tundi (=1). Näidatud on kolme samal ajal tehtud erineva stimulatsiooni tulemuste keskmised väärtused ja nende standardviga. Kontrolldoonori rakkude katse IFN- $\gamma$  stimulatsiooni 24 tunni ajapunktis ja astmaga doonori katse kontrolli 72 tunni ajapunkti puhul on näidatud kahe väärtuse keskmised. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

## 2.4. ARUTELU JA JÄRELDUSED

Astma on krooniline põletikuline hingamisteede haigus, mis on sageli seotud ülitundlikkusega allergeenidele (Nijs, Venekamp, & Bel, 2013). miRNA-d on geeniekspressiooni regulaatorid ning seetõttu mõjutavad nad väga paljusid bioloogilisi protsesse organismis. Haiguslike olukordadega kaasnevad sageli muutused miRNA-de ekspressioonis ning need muutused mõjutavad omakorda haiguste teket ja kulgu (Orang, Safaralizadeh, & Kazemzadeh-Bavili, 2014). Varasemalt on teada, et miR-146a/b reguleerivad alla organismis põletikulisi reaktsioone (Huang, *et al.*, 2012) ning seetõttu soovisime uurida käesolevas bakalaureuse

töös, kuidas mõjutavad mitmed tsütokiinid miR-146a/b ekspressiooni primaarsetes HBEC rakkudes, mis pärinevad kas tervelt doonorilt või astma haigelt.

Selles töös läbi viidud katsetega näidati, et nii tervetes kui ka astmaga doonori primaarsetes HBEC rakkudes toimus miR-146a ülesregulatsioon TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ja IL-17A stimulatsioonil. miR-146b ülesregulatsioon toimus ühe terve doonori HBEC rakkudes vaid TNF- $\alpha$  ning astmaga doonori rakkudes IFN- $\gamma$  stimulatsioonil.

On leitud üle 50 tsütokiini ja kemokiini, mis mõjutavad ühel või teisel moel astma teket või kulgu. IL-17A suurenenud ekspressioon on iseloomulik neutrofiilsele astmale (Ramirez-Velazquez, *et al.*, 2013). TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ja IFN- $\gamma$  on üldised ägedate ja krooniliste põletikuliste protsessidega seotud tsütokiinid (Lüth, *et al.*, 2011; Eigenbrod, Bode, & Dalpke, 2013). IFN- $\alpha$ 2a tootmine käivitatakse viirusnakkuste puhul (Feng, Heyden, & Ratner, 2003). Ülemiste hingamisteede viirusnakkused võivad põhjustada astma ägenemist ning arvatakse, et nad võivad paljudel juhtudel olla ka otseselt üheks astmat põhjustavaks teguriks (Tan, 2005). Tsütokiinide patoloogiline roll astmas pole täpselt teada, kuid on teada, et tsütokiinid IFN- $\gamma$  ja TNF- $\alpha$ , mis antud töös mõjutasid miR-146a/b ekspressiooni, mõjutavad astma käiku organismis. IFN- $\gamma$ -l on allergilist astmat vähendav toime, kuna ta arvatavalt vähendab Th2 rakkude suhtelist hulka. Samas võimendab IFN- $\gamma$  kudedes esinevat põletikku ning võib seetõttu ka raskendada astma sümptomeid ja kulgu (Soyka, *et al.*, 2012; Rebane, *et al.*, 2012). TNF- $\alpha$  puhul on näidatud, et see suurendab raskekujulise astma mõju organismile, suurendades põletikku kopsuepiteeli koes (Thomas, Yates, & Barnes, 1995; Barnes, 2008).

On teada, et miR-146a/b osaleb kopsu silelihasrakkudes põletikuliste tsütokiinide alla regulatsioonil (Comer, *et al.*, 2014). Käesolevas töös uuriti esimesena terve doonori HBEC rakkudes miR-146a/b ja nende poolt teadaolevalt mõjutatavate geenide CCL5 ja IL-8 ekspressiooni põletikuliste tsütokiinidega stimulatsioonil. Varem teadaolevate Th2 tüüpi põletikuga seotud tsütokiinidega IL-4 ja IL-13 ei toimunud kummagi mikroRNA ülesregulatsiooni terve doonori HBEC rakkudes, kuid kinnitust leidis IL-17A, TNF- $\alpha$  ja IL-1 $\beta$  stimulatsiooniga miR-146a ülesregulatsioon. Terve doonori rakkudes ei toimunud miR-146b ekspressioonis 48 tunni ajapunktis ühegi tsütokiiniga stimulatsioonil märgatavaid muutusi.

Astmaatiku ja terve doonori HBEC rakkudes oli näha erinevust nii miR-146a kui ka miR-146b ekspressioonis. Terve doonori HBEC rakkudes stimulatsioonil TNF- $\alpha$ -ga, ekspresseerus miR-146a üles 72 tunni juures 20,6 korda, kuid astmaatiku HBEC rakkudes toimus miR-146a

ülesstimulatsioon samades tingimustes 2,4 kordselt. Kontrollisiku HBEC rakkude puhul stimuleeris miR-146b ekspressiooni üles TNF- $\alpha$ , kuid astmaatiku HBEC rakkudes toimus ülesekspressioon IFN- $\gamma$ -ga. Antud tulemused ja varasemad teadmised miR-146a/b funktsioonide kohta koos viitavad võimalusele, et miR-146 perekonnal on oluline roll HBEC rakkudes põletikuliste protsesside reguleerimisel. Kuna astmaatikutelt pärinevates bronhiaalse epiteeli rakkudes oli miR-146a ekspressioon stimulatsioonijärgselt madalam kui terve doonori rakkudes, võib oletada, et seal on miR-146a ekspressiooni regulatsioon häiritud. Kuna katsetes kasutati ainult kahe terve doonori ja ühe astmahaige rakke, siis ei ole võimalik järeldada, kas miR-146a/b ekspressiooni regulatsioonis on muutusi astmahaigetelt pärinevates HBEC rakkudes võrreldes tervete doonoritega või tuleneb selline tulemuste lahknevus erinevustest eri doonoritelt pärinevates rakkude vahelisest erinevusest. Seetõttu oleks vajalik katsete kordamine, kasutades rakke võimalikult paljudest erinevatest doonoritest.

miR-146a/b poolt mõjutatavate geenide puhul oli näha tugev CCL5 ekspressiooni ülesregulatsioon IFN- $\gamma$  ning IFN- $\alpha$ 2a stimulatsioonil. IL-8 ekspressiooni taset reguleerisid üles IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-1 $\beta$  ja IFN- $\alpha$ 2a, mis kinnitab rakkude stimulatsiooni toimumist antud katsetes. CCL5 ja IL-8 ülesekspressiooniga kutsutakse esile immuunrakkude ümberpaiknemine põletikulisse kohta, mis suurendab lokaalset põletikku (Liu, *et al.*, 2012). On teada, et miR-146a/b inhibeerib CCL5 ja IL-8 ekspressiooni kopsu alveooli epiteeli rakuliinis A549 (Perry, *et al.*, 2008). Käesoleva töö ühe järgmise suunana oleks huvitav vaadata, kas miR-146a/b inhibeerivad CCL5 ja IL-8 ekspressiooni ka HBEC rakkudes.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöös uuriti miR-146a/b ning nende poolt mõjutatavate geenide CCL5 ja IL-8 ekspressiooni terve doonori ja astmaatilise patsiendi primaarsetes bronhiaalsetes epiteeli rakkudes, et teada saada, kas ja kuidas reguleeritakse miR-146a/b ekspressiooni HBEC rakkudes. Selleks stimuleeriti HBEC rakke mitmete tsütokiinidega: IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-13, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ 2a ja IFN- $\gamma$  ning leiti, et erinevad tsütokiinid mõjutavad miR-146a/b ja nende märklaudade ekspressiooni erinevalt. 48 tunni katses, terve doonori rakkude puhul põhjustasid suurenenud miR-146a ekspressiooni stimulatsioonid IL-17A, TNF- $\alpha$  ja IL-1 $\beta$ -ga. Samades tingimustes terve doonori HBEC rakkudes ei mõjutanud miR-146b ekspressiooni ükski stimuleerimisel kasutatud tsütokiin. Olulisi erinevusi võis märgata ajapunkti katses. Võrreldes terve ja astmaga doonori HBEC rakkude stimulatsiooni, oli näha, et TNF- $\alpha$  reguleeris üles terve doonori nii miR-146a/b ekspressiooni kui ka miR-146a ekspressiooni astmaatiku HBEC rakkudes. Astmaga doonori HBEC rakkudes toimus miR-146b ülesregulatsioon INF- $\gamma$  stimulatsioonil. Põletikulistes protsessides on tsütokiinidel INF- $\gamma$  ja TNF- $\alpha$ , mõlemal põletikku suurendav toime. CCL5 ja IL-8 ekspressiooni katse kinnitas, et HBEC rakkude stimulatsioon tsütokiinidega oli edukas, põhjustades suurenenud CCL5 ja IL-8 ekspressiooni tasemed TNF- $\alpha$  kui ka INF- $\gamma$  stimulatsioonil. Varasemalt on teada, et miR-146a/b osalevad organismi põletikuliste protsesside allasurumises. Edasised katsed on vajalikud, et teada saada, kas miR-146a/b mõjutavad HBEC rakkudes põletikuliste protsesside kulgu astma korral.

## **MiR-146a and miR-146b expression in human primary bronchial epithelial cells**

Kerstin Peedosaar

### **SUMMARY**

Asthma is one of the most common diseases in the world, from which around 300 million people suffer worldwide. The disease is characterized by cough, shortness of breath, wheezing and chest tightness. Different microRNAs have been shown to play various roles in asthma; however, their exact functions are often not well described.

In current thesis, the expression of miR-146a and miR-146b in unstimulated and stimulated human primary bronchial epithelial cells was studied. We showed that pro-inflammatory cytokines IL-17A, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  upregulated the production of miR-146a, but none of the used cytokines stimulated miR-146b expression in healthy HBEC cells. In the experiment, where we stimulated HBEC cells using several different time periods, TNF- $\alpha$  upregulated miR-146a/b expression in both, healthy and asthmatic donor HBEC cells. In case of asthmatic donor cells, miR-146a expression was lower than in healthy donor HBEC cells. In asthmatic donor HBEC cells miR-146b was upregulated by INF- $\gamma$ . This indicates that HBEC cells from asthmatic and healthy donors have differences in their capacity to produce miR-146a/b, which are known to have ability to suppress inflammation. Further studies with bigger donor groups are needed to confirm the results and to show whether miR-146a/b have a role in controlling inflammatory processes in bronchial epithelium in asthma.

## TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajaid Ana Rebane, Toomas Runnel ja Mariliis Klaas, nende suurepärase toe, juhendamise ja abi eest. Samuti tänan teisi RNA bioloogia uurimisgrupi liikmeid, kes aitasid mind minu töös, sealhulgas eriline tänu läheb Helen Hermannile, kes andis väga häid nõuandeid nii laboripraktikas kui ka bakalaureuse töö koostamises. Lisaks soovin anda oma tänu Dr. Bogdan Jakielale, kes kinkis meile inimese primaarsed bronhiaalsed epiteeli rakud, võimaldades meil antud uurimust läbi viia.

# KASUTATUD KIRJANDUS

1. (GINA), G. I. (2015). *Global strategy for asthma management and prevention*. Kasutamise kuupäev: 18. 04 2015. a., allikas [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org) : [http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA\\_Report\\_2015.pdf](http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2015.pdf)
2. Adrian Shifren, C. W. (2012). Mechanisms of Remodeling in Asthmatic Airways. *Journal of Allergy* , 1-12.
3. Aldinucci, D., & Colombatti, A. (2014). The Inflammatory Chemokine CCL5 and Cancer Progression. *Mediators of Inflammation* , 1-12.
4. Andrew E. Williams, H. L.-S. (2009). MicroRNA Expression Profiling in Mild Asthmatic Human Airways and Effect of Corticosteroid Therapy. *Plos One* , 1-11.
5. Arroyoa, J. D., Chevilleta, J. R., Kroha, E. M., Rufa, I. K., Pritchardb, C. C., Gibsonb, D. F., et al. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 5003-5008.
6. Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P., & Bartel, D. P. (2009). The impact of microRNAs on protein output . *Nature* , 64-71.
7. Balfour-Lynn, I. M. (2003). Asthma in cystic fibrosis. *JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY OF MEDICINE* , 30-34.
8. Banerjee, A., Schambach, F., DeJong, C. S., Hammond, S. M., & Reiner, S. L. (2010). Micro-RNA-155 Inhibits IFN- $\gamma$  Signaling in CD4<sup>+</sup> T cells. *European Journal of Immunology* , 225-231.
9. Barnes, P. J. (2008). The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of Clinical Investigation* , 3546-3556.
10. Bel, E. H., Sousa, A., Fleming, L., Bush, A., Chung, K. F., Versnel, J., et al. (2011). Diagnosis and definition of severe refractory asthma: an international consensus statement from the Innovative Medicine Initiative (IMI). *Thorax* , 910-917.
11. Berezikov, E. (2011). Evolution of microRNA diversity and regulation in animals . *Nature* , 1-15.
12. Bhaumik, D., Scott, G., Schokrpur, S., Patil, C., Campisi, J., & Benz, C. (2008). Expression of microRNA-146 suppresses NF- $\kappa$ B activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene* , 5643-5647.
13. Bickel, M. (1993). The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *Journal of Periodontology* , 456-460.
14. Booton, R. (2014). Emerging Role of MicroRNAs and Long Noncoding RNAs in Respiratory Disease. *Chest* , 193-204.
15. Bousquet, J., Vignola, A. M., Campbell, A. M., Chanez, P., Lacoste, P., Michel, F. B., et al. (1993). Activation by Histamine of Bronchial Epithelial Cells from Non-asthmatic Subjects. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* , 411-417.
16. Brian S. Comer, B. C.-M. (2014). MicroRNA-146a and microRNA-146b expression and anti-inflammatory function in human airway smooth muscle. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* , L727-L734.
17. Campbell, A. M. (1994). Low-affinity receptor for IgE on human bronchial epithelial cells in asthma. *Immunology* , 506-508.

18. Chaudhuri, R., Livingston, E., McMahon, A. D., Thomson, L., Borland, W., & Thomson, N. C. (2003). Cigarette Smoking Impairs the Therapeutic Response to Oral Corticosteroids in Chronic Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* , 1308-1311.
19. Chen CZ, L. L. (2003). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* .
20. Cockcroft, D. W., Hargreave, F. E., O'Byrne, P. M., & Boulet, L.-P. (2007). Understanding allergic asthma from allergen inhalation tests. *Canadian Respiratory Journal* , 414-418.
21. Comer, B. S., Camoretti-Mercado, B., Kogut, P. C., Halayko, A. J., Solway, J., & Gerthoffer, W. T. (2014). MicroRNA-146a and microRNA-146b expression and anti-inflammatory function in human airway smooth muscle. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* , L727-L734.
22. Curtale, G., Citarella, F., Carissimi, C., Goldoni, M., Carucci, N., Fulci, V., et al. (2010). An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. *Blood* , 265-273.
23. Deo, S. S., Mistry, K. J., Kakade, A. M., & Niphadkar, P. V. (2010). Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. *Lund India* , 66-71.
24. Devalia, J., Campbell, A., Sapsford, R., Rusznak, C., Quint, D., Godard, P., et al. (1993). Effect of nitrogen dioxide on synthesis of inflammatory cytokines expressed by human bronchial epithelial cells in vitro. *American Journal of Respiratory and Cell Molecular Biology* , 271-278.
25. Dinarello, C. A. (2000). Proinflammatory Cytokines. *Chest Journal* , 503-508.
26. Edwards, M. R., N Regamey, M Varelle, E Kieninger, A Gupta, A Shoemark, et al. (2012). Impaired innate interferon induction in severe therapy resistant atopic asthmatic children. *Mucosal Immunology* , 797–806.
27. Eigenbrod, T., Bode, K. A., & Dalpke, A. H. (2013). Early Inhibition of IL-1b Expression by IFN-g Is Mediated by Impaired Binding of NF-kB to the IL-1b Promoter but Is Independent of Nitric Oxide. *The Journal of Immunology* , 1-9.
28. Esteller, M. (2008). *Epigenetics in Biology and Medicine*. United States: Boca Raton : CRC Press .
29. Fahy, J. V. (2014). Type 2 inflammation in asthma — present in most, absent in many. *Nature Reviews Immunology* , 57-65.
30. Faraoni, I., Antonetti, F. R., Cardone, J., & Bonmassar, E. (2009). miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* , 497-505.
31. Feng, M.-J., Shi, F., Qiu, C., & Peng, W.-K. (2012). MicroRNA-181a, -146a and -146b in spleen CD4+ T lymphocytes play proinflammatory roles in a murine model of asthma. *International Immunopharmacology* , 347-353.
32. Feng, X., Heyden, N. V., & Ratner, L. (2003). Alpha Interferon Inhibits Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Assembly by Preventing Gag Interaction with Rafts. *Journal of Virology* , 13389–13395.
33. Février, B., & Raposo, G. (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current Opinion in Cell Biology* , 415-421.
34. Flavie Sicard, M. H. (2013). Targeting miR-21 for the Therapy of Pancreatic Cancer. *Molecular Therapy* , 986-994.
35. Friedländer, M. R. (2014). Evidence for the biogenesis of more than 1000 novel human microRNAs. *Genome Biology* , 1-17.



36. Garofalo M, C. C. (2011). microRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* , 25-43.
37. Gracias, D. T., & Katsikis, P. D. (2011). MicroRNAs: Key Components of Immune Regulation. rmt: B. P. al., *Crossroads between innate and adaptive immunity III*, (lk 15-26). New York: Springer.
38. Green, M. D., Huang, S. X., & Snoeck, H.-W. (3 2013. a.). Stem cells of the respiratory system: from identification to differentiation into functional epithelium. *BioEssays* , lk 261-270.
39. Gu, S., Jin, L., Zhang, F., Sarnow, P., & Kay, M. A. (2009). The biological basis for microRNA target restriction to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology* , 144-150.
40. Hackett, T.-L., Singhera, G. K., Shaheen, F., Hayden, P., Jackson, G. R., Hegele, R. G., et al. (2011). Intrinsic Phenotypic Differences of Asthmatic Epithelium and Its Inflammatory Responses to Respiratory Syncytial Virus and Air Pollution. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* , 1090-1100.
41. Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., et al. (2010). Transcriptome-wide Identification of RNA-Binding Protein and MicroRNA Target Sites by PAR-CLIP. *Cell* , 129-141.
42. He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., et al. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* , 828-833.
43. Holgate, S. T., & Polosa, R. (March 2008. a.). Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature* , 218-230.
44. Hou, J., Wang, P., Lin, L., Liu, X., Ma, F., Huazhang, et al. (2009). MicroRNA-146a Feedback Inhibits RIG-I-Dependent Type I IFN Production in Macrophages by Targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *The Journal of Immunology* , 2150-2158.
45. Huang, S. X., Islam, M. N., O'Neill, J., Hu, Z., Yang, Y.-G., Chen, Y.-W., et al. (2013). Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology* , 84-91.
46. Huang, Y., Crawford, M., Higueta-Castro, N., Nana-Sinkam, P., & Ghadiali, S. N. (2012). miR-146a regulates mechanotransduction and pressure-induced inflammation in small airway epithelium. *The FASEB Journal* , 3351–3364.
47. Janeway, C. T. (2001). *Immunobiology (5th edition)*. New York and London: Garland Science.
48. Jefferis, R., & Kumararatne, D. S. (1990). Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *The Journal of Translational Immunology* , 357-367.
49. Jeffrey W. Tyner, E. Y., & Alexander Patterson, M. C. (2006). Blocking airway mucous cell metaplasia by inhibiting EGFR antiapoptosis and IL-13 transdifferentiation signals. *The Journal of Clinical Investigation* , 309-321.
50. Jia-wang Wang, K. L. (2011). Regulating the Regulators: microRNA and Asthma. *World Allergy Organization Journal* , 94-103.
51. Jingyi Li, Y. Q. (2013). The role of microRNAs in B-cell development and function. *Cellular and Molecular Immunology* , 107-112.
52. John M, H. S. (1997). Human airway smooth muscle cells express and release RANTES in response to T helper 1 cytokines: regulation by T helper 2 cytokines and corticosteroids. *The Journal of Immunology* , 1841-1847.

53. Jun-Ming Zhang, J. A. (2009). Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinic* , 27-37.
54. Jurkin, J., Schichl, Y. M., Koeffel, R., Bauer, T., Richter, S., Konradi, S., et al. (2010). miR-146a Is Differentially Expressed by Myeloid Dendritic Cell Subsets and Desensitizes Cells to TLR2-Dependent Activation. *The Journal of Immunology* , 4955-4965.
55. Kaplan, A. G., Balter, M. S., Bell, A. D., Kim, H., & McIvor, R. A. (2009). Diagnosis of asthma in adults. *CMAJ* , E210-E220.
56. Kay, A. B. (2000). Overview of 'Allergy and allergic diseases: with a view to the future'. *British Medical Bulletin* , 843-864.
57. Kim, H., & Mazza, J. (2011). Asthma. *Allergy, asthma & clinical immunology* , 1-9.
58. Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics* , 597-610.
59. Kutty, R. K., Nagineeni, C. N., Samuel, W., Vijayasathy, C., Jaworski, C., Duncan, T., et al. (2013). Differential regulation of microRNA-146a and microRNA-146b-5p in human retinal pigment epithelial cells by interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interferon- $\gamma$ . *Molecular Vision* , 737-750.
60. Kwon OJ, J. P. (1995). Glucocorticoid inhibition of RANTES expression in human lung epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* , 488-496.
61. Lüth S, S. J. (2011). Chronic inflammatory IFN- $\gamma$  signaling suppresses hepatocarcinogenesis in mice by sensitizing hepatocytes for apoptosis. *Cancer Research* , 3763-3771.
62. Lal, A., Navarro, F., Maher, C., Maliszewski, L. E., Yan, N., O'Day, E., et al. (2009). miR-24 inhibits cell proliferation by suppressing expression of E2F2, MYC and other cell cycle regulatory genes by binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements. *Mol Cell* .
63. Lambrecht, B. N., & Hammad, H. (2009). Biology of Lung Dendritic Cells at the Origin of Asthma. *Immunity* , 412-424.
64. Lambrecht, B. N., & Hammad, H. (2012). The airway epithelium in asthma. *Nature Medicine* , 684-692.
65. Le Cras, T. D., Acciani, T. H., Mushaben, E. M., Kramer, E. L., Pastura, P. A., Hardie, W. D., et al. (2010). Epithelial EGF receptor signaling mediates airway hyperreactivity and remodeling in a mouse model of chronic asthma. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* , L414-L421.
66. Lee, T.-H., Song, H. J., & Park, C.-S. (2014). Role of inflammasome activation in development and exacerbation of asthma. *Asia Pacific Allergy* , 187-196.
67. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* , 415-419.
68. Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., & Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal* , 4663-4670.
69. Lemanske, R. F., & Busse, W. W. (2010). Asthma: Clinical expression and molecular mechanisms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* , S95-S102.
70. Levi-Schaffer, F., Garbuzenko, E., Rubin, A., Reich, R., Pickholz, D., Gillery, P., et al. (1999). Human eosinophils regulate human lung- and skin-derived fibroblast properties in vitro: A role for transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 9660-9666.

71. Lewis, B. P., Shih, I.-h., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Burge, C. B. (2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* , 787-798.
72. Li J, J. X. (2003). Signaling intermediates required for NF-kappa B activation and IL-8 expression in CF bronchial epithelial cells. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* , L307-L315.
73. Li, Y., Ma, X., Buscaglia, L. E., & Barker, J. R. (2011). MicroRNAs in NF-kB signaling. *Journal of Molecular Cell Biology* , 159-166.
74. Liu, H., Ning, H., Men, H., Hou, R., Fu, M., Zhang, H., et al. (2012). Regulation of CCL5 Expression in Smooth Muscle Cells Following Arterial Injury. *Plos One* .
75. Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J., & Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature Cell Biology* , 719-723.
76. Liu, X., Olsen, J., Agerbo, E., Yuan, W., Cnattingius, S., Gissler, M., et al. (2014). Birth weight, gestational age, fetal growth and childhood asthma hospitalization. *Allergy, asthma & clinical immunology* , 1-10.
77. Lloyd, C. M., & Saglani, S. (2010). Asthma and allergy. The emerging epithelium. *Nature Medicine* , 273-274.
78. Lloyd, C., & Hessel, E. (2010). Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nature Reviews Immunology* , 838-848.
79. Locksley, R. M. (2010). Asthma and Allergic Inflammation. *Cell* , 777-783.
80. Loetscher, B. M. (2001). Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature Immunology* , 123-128.
81. Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., et al. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* , 834-838.
82. Lu, T. X., & Rothenberg, M. E. (2013). Diagnostic, Functional and Therapeutic Roles of MicroRNA in Allergic Diseases. *The Journal of Clinical Immunology* , 1-25.
83. Lu, T. X., Munitz, A., & Rothenberg, M. E. (2009). MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. *The Journal of Immunology* , 4994-5002.
84. Mühl, H., & Pfeilschifter, J. (2003). Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon- $\gamma$ . *International Immunopharmacology* , 1247-1255.
85. Malumbres, R., Sarosiek, K. A., Cubedo, E., Ruiz, J. W., Jiang, X., Gascoyne, R. D., et al. (2009). Differentiation stage-specific expression of microRNAs in B lymphocytes and diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* , 3754-3764.
86. Mario Cazzola, C. P. (2012). Pharmacology and Therapeutics of Bronchodilators. *Pharmacological Reviews* , 450-504.
87. Martinez-Anton, A., Sokolowska, M., Kern, S., Davis, A. S., Alsaaty, S., Taubenberger, J. K., et al. (2013). Changes in microRNA and mRNA Expression with Differentiation of Human Bronchial Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* , 384-395.
88. Martinez-Nunez, R. T., Bondanese, V. P., Louafi, F., Francisco-Garcia, A. S., Rupani, H., Bedke, N., et al. (2014). A MicroRNA Network Dysregulated in Asthma Controls IL-6 Production in Bronchial Epithelial Cells. *Plos One* , 1-15.
89. Masoli, M. (2004). The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy* , 469-478.

90. Meisgen F, X. L. (2014). MiR-146a negatively regulates TLR2-induced inflammatory responses in keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* , 1931-1940.
91. Melanie J. Jardim, L. D.-S. (2012). Distinct MicroRNA Expression in Human Airway. *AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY* , 536-542.
92. Meng-Jie Feng, F. S.-K. (2012 ). MicroRNA-181a, -146a and -146b in spleen CD4+ T lymphocytes play proinflammatory roles in a murine model of asthma. *International Immunopharmacology* , 347–353.
93. Michael J. Holtzman, J. D. (2002). Immunity, Inflammation, and Remodeling in the Airway Epithelial Barrier: Epithelial-Viral-Allergic Paradigm. *Physiological Reviews* , 19-46.
94. Mikami, Y., Matsuzaki, H., Horie, M., Noguchi, S., Jo, T., Narumoto, O., et al. (2014). Lymphotoxin  $\beta$  Receptor Signaling Induces IL-8 Production in Human Bronchial Epithelial Cells. *Plos One* , 1-21.
95. *miRBase*. (kuupäev puudub). Allikas: Browse miRBase by species: <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>
96. Morrissey, E. E., & Hogan, B. L. (2010). Preparing for the First Breath: Genetic and Cellular Mechanisms in Lung Development. *Developmental Cell* , 1-33.
97. Nakasa, T., Miyaki, S., Okubo, A., Hashimoto, M., Nishida, K., Ochi, M., et al. (2009). Expression of MicroRNA-146 in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue. *Arthritis & Rheumatology* , 1284-1292.
98. Nijs, S. B., Venekamp, L. N., & Bel, E. H. (2013). Adult-onset asthma: is it really different? *European Respiratory Review* , 44-52.
99. Orang, A. V., Safaralizadeh, R., & Kazemzadeh-Bavili, M. (2014). Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *International Journal of Genomics* , 1-15.
100. Pei, G., Bronietzki, M., & Gutierrez, M. G. (2012). Immune regulation of Rab proteins expression and intracellular transport. *Journal of Leukocyte Biology* , 41-50.
101. Perry, M. M., Moschos, S. A., Williams, A. E., Shepherd, N. J., Larner-Svensson, H. M., & Lindsay, M. A. (2008). Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1 $\beta$ -induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *The Journal of Immunology* , 5689-5698.
102. Perry, M. M., Williams, A. E., Tsitsiou, E., Larner-Svensson, H. M., & Lindsay, M. A. (2009). Divergent intracellular pathways regulate interleukin-1 $\beta$ -induced miR-146a and miR-146b expression and chemokine release in human alveolar epithelial cells. *FEBS Letters* , 3349-3355.
103. Piganeau, N. (2008). Micro-RNA (miRNA). rmt: S. Müller, & S. Müller (Toim.), *Nucleic acids from A to Z: a concise encyclopedia* (lk 175). Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
104. Pillai, R. S. (2005). MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA? . *RNA* , 1-9.
105. Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., et al. (2005). Inhibition of Translational Initiation by Let-7 MicroRNA in Human Cells. *Science* , 1573-1576.
106. Prabir Ray, L. Y.-H. (1997). Selective Up-regulation of Cytokine-induced RANTES Gene Expression in Lung Epithelial Cells by Overexpression of I  $\kappa$  B. *The Journal of Biological Chemistry* , 20191-20197.
107. Ramirez-Velazquez, C., Castillo, E. C., Guido-Bayardo, L., & Ortiz-Navarrete, V. (2013). IL-17-producing peripheral blood CD177+ neutrophils increase in allergic asthmatic subjects. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* , 1-8.

108. Rawlins, E. L., Clark, C. P., Xue, Y., & Hogan, B. L. (2009). The Id2<sup>+</sup> distal tip lung epithelium contains individual multipotent embryonic progenitor cells. *Development* , 3741-3745.
109. Rebane, A. (2013). MicroRNAs: Essential players in the regulation of inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* , 15-26.
110. Rebane, A., Zimmermann, M., Aab, A., Baurecht, H., Koreck, A., Karelson, M., et al. (2012). Mechanisms of IFN- $\gamma$ -induced apoptosis of human skin keratinocytes in patients with atopic dermatitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* , 1297-1306.
111. Reinhart, B. J. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* , 1-6.
112. Rock, J. R., & Hogan, B. L. (2011). Epithelial Progenitor Cells in Lung Development, Maintenance, Repair, and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* , 493-512.
113. Rodriguez, A., Vigorito, E., Clare, S., Warren, M. V., Couttet, P., Soond, D. R., et al. (2007). Requirement of *bic/microRNA-155* for Normal Immune Function. *Science*.
114. Rusca, N., & Monticelli, S. (2011). MiR-146a in Immunity and Disease. *Molecular Biology International* .
115. Schuh, J. M., Blease, K., Brühl, H., Mack, M., & Hogaboam, C. M. (2003). Intrapulmonary targeting of RANTES/CCL5 responsive cells prevents chronic fungal asthma. *European Journal of Immunology* , 3080-3090.
116. Sen, C. K. (2015). *MicroRNA in Regenerative Medicine*. London: Elsevier.
117. Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2007). Peanut allergy: Emerging concepts and approaches for an apparent epidemic. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* , 491-503.
118. Sonenberg, M. R. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY* , 586-593.
119. Song Z, C. V. (1996). Polymorphic nucleotides within the human IL-4 promoter that mediate overexpression of the gene. *The Journal of Immunology* , 424-429.
120. Soria, G., & Ben-Baruch, A. (2008). The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer . *Cancer Letters* , 271-285.
121. Soyka, M. B., Wawrzyniak, P., Eiwegger, T., Holzmann, D., Treis, A., Wanke, K., et al. (2012). Defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: The regulation of tight junctions by IFN- $\gamma$  and IL-4. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* , 1087-1096.
122. Stahl, H. F., Fauti, T., Ullrich, N., Bopp, T., Kubach, J., Rust, W., et al. (2009). miR-155 Inhibition Sensitizes CD4<sup>+</sup> Th Cells for TREG Mediated Suppression. *Plos One* .
123. Standiford, T. J., Kunkel, S. L., Basha, M. A., Chensue, S. W., Lynch, J. P., Toews, G. B., et al. (1990). Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *The Journal of Clinical Investigation* , 945-953.
124. Stark, A., Brennecke, J., Bushati, N., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2005). Animal MicroRNAs Confer Robustness to Gene Expression and Have a Significant Impact on 3'UTR Evolution. *Cell* , 1-14.
125. Stone, K. D., Prussin, C., & Metcalfe, D. D. (2011). IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* , S73-S80.
126. Sudha S Deo, K. J. (2010). Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. *Lung India* , 66-71.

127. Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Stemmann, C., Satoskar, A. R., Sleckman, B. P., & Glimcher, L. H. (2002). Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN- $\gamma$  production in CD4 and CD8 T cells. *Science* , 338-342.
128. Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K.-J., & Baltimore, D. (2006). NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 12481-12486.
129. Tan, W. (2005). Viruses in asthma exacerbations. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* , 21-26.
130. Thai, T.-H., Calado, D. P., Casola, S., Ansel, K. M., Xiao, C., Xue, Y., et al. (2007). *Regulation of the Germinal Center Response by MicroRNA-155*. 604-608: Science.
131. Theodore J. Standiford, S. L. (1990). Interleukin-8 Gene Expression by a Pulmonary Epithelial Cell Line. A model for cytokine networks in the lung. *The Journal of Clinical Investigation* , 1945-1953.
132. Thomas X Lu, E.-J. L. (2012). MiR-375 is down-regulated in epithelial cells after IL-13 stimulation and regulates an IL-13 induced epithelial transcriptome. *Nature* , 388-396.
133. Thomas, P. S., Yates, D. H., & Barnes, P. J. (1995). Tumor necrosis factor- $\alpha$  increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects Read More: [http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.152.1.7599866?url\\_ver=Z39.88-2003&rft\\_id=ori:rid:crossref.org&rft\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed#.VVSZ6kLRA2w](http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.152.1.7599866?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub%3dpubmed#.VVSZ6kLRA2w). *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* , 76-80.
134. Tosi, M., Stark, J., Hamedani, A., Smith, C., Gruenert, D., & Huang, Y. (1992). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)-dependent and ICAM-1-independent adhesive interactions between polymorphonuclear leukocytes and human airway epithelial cells infected with parainfluenza virus type 2. *Journal of Immunology* , 3345-3349.
135. Tsitsiou, E., Williams, A. E., Moschos, S. A., Patel, K., Rossios, C., Jiang, X., et al. (2011). Transcriptome analysis shows activation of circulating CD8<sup>+</sup> T cells in patients with severe asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* , 95-103.
136. Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispens, T. (2014). IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology* , 1-17.
137. Vignola, A. M., Chanez, P., Campbell, A. M., Pinel, A. M., Bousquet, P., Michel, F.-B., et al. (1994). Quantification and localization of HLA-DR and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) molecules on bronchial epithelial cells of asthmatics using confocal microscopy. *Clinical & Experimental Immunology* , 104-109.
138. Wagener, A. H., Zwinderman, A. H., Luiten, S., Fokkens, W. J., Bel, E. H., Sterk, P. J., et al. (2013). The Impact of Allergic Rhinitis and Asthma on Human Nasal and Bronchial Epithelial Gene Expression. *Plos One* , 1-7.
139. Wenzel, S. E. (2006). Asthma: defining of the persistent adult phenotypes . *The Lancet* , 804-813.
140. Williams, T. J. (2004). The eosinophil enigma. *The Journal of Clinical Investigation* , 507-509.
141. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* , 228-234.
142. Wood, L. G., Baines, K. J., Fu, J., Scott, H. A., & Gibson, P. G. (2012). The Neutrophilic Inflammatory Phenotype Is Associated With Systemic Inflammation in Asthma. *Chest* , 86-93.

143. Woodruff, P. G., Modrek, B., Choy, D. F., Jia, G., Abbas, A. R., Ellwanger, A., et al. (2009). T-helper Type 2–driven Inflammation Defines Major Subphenotypes of Asthma. *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* , 388-395.
144. Wu, X.-B., Wang, M.-Y., Zhu, H.-Y., Tang, S.-Q., You, Y.-D., & Xie, Y.-Q. (2014). Overexpression of microRNA-21 and microRNA-126 in the patients of bronchial asthma. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* , 1307-1312.
145. Xiang, M., Birkbak, N. J., Vafaizadeh, V., Walker, S. R., Yeh, J. E., Liu, S., et al. (2014). STAT3 Induction of MiR-146b Forms a Feedback Loop to Inhibit the NF- $\kappa$ B to IL-6 Signaling Axis and STAT3-Driven Cancer Phenotypes. *Science Signaling* , 1-28.
146. Xiao, C., Puddicombe, S. M., Field, S., Haywood, J., Broughton-Head, V., Puxeddu, I., et al. (2011). Defective epithelial barrier function in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* , 549-556.
147. Xie, Y.-F., Shu, R., Jiang, S.-Y., Liu, D.-L., Ni, J., & Zhang, X.-L. (2013). MicroRNA-146 inhibits pro-inflammatory cytokine secretion through IL-1 receptor-associated kinase 1 in human gingival fibroblasts. *Journal of Inflammation* .
148. Xie, Y.-f., Shu, R., Jiang, S.-y., Song, Z.-c., Guo, Q.-m., Dong, J.-c., et al. (2014). miRNA-146 negatively regulates the production of pro-inflammatory cytokines via NF- $\kappa$ B signalling in human gingival fibroblasts. *Journal of Inflammation* , 1-9.
149. Yang, L., Boldin, M. P., Yu, Y., Liu, C. S., Ea, C.-K., Ramakrishnan, P., et al. (2012). miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice. *The Journal of Experimental Medicine* , 1655-1670.
150. Yébenes, V. G., Belver, L., Pisano, D. G., González, S., Villasante, A., Croce, C., et al. (2008). miR-181b negatively regulates activation-induced cytidine deaminase in B cells. *The Journal of Experimental Medicine* , 2199-2206.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Kerstin Peedosaar

(sünnikuupäev: 11.03.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  
„MikroRNA-146 perekonna geenide ekspressioon primaarsetes kopsuepiteelrakkudes“,  
  
mille juhendaja on Ana Rebane, Toomas Runnel ja Mariliis Klaas,
  - 1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 01.01.2020 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015